

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年1月3日 (03.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/000278 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/00, 9/06,  
7/00, 7/48, 47/30, 47/48, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/06227

(22) 国際出願日: 2002年6月21日 (21.06.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-190330 2001年6月22日 (22.06.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和  
醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一  
丁目6番1号 Tokyo (JP).

(MURAKAMI, Tatsuya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町  
田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東  
京研究所内 Tokyo (JP). 櫻井 紀子 (SAKURAI, Noriko)  
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目  
6番1号 協和醗酵工業株式会社 本社内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山崎 基生 (YA-  
MASAKI, Motoo) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区  
大手町一丁目6番1号 協和醗酵工業株式会社 本社  
内 Tokyo (JP). 須澤 敏行 (SUZAWA, Toshiyuki) [JP/JP];  
〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和  
醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 村上 達也

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: OINTMENTS

(54) 発明の名称: 軟膏剤

(57) Abstract: Ointments containing a chemically modified physiologically active polypeptide (wherein the chemically modified physiologically active polypeptide is exemplified by a physiologically active polypeptide chemically modified with at least one polyalkylene glycol and the physiologically active polypeptide to be chemically modified is exemplified by superoxide dismutase, interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$ , interferon- $\gamma$  and granulocyte colony-stimulating factor).

(57) 要約:

化学的に修飾された生理活性ポリペプチド (該化学的に修飾された生理活性ポリペプチドとしては、少なくとも1個のポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチド等があげられ、化学的に修飾される生理活性ポリペプチドとしては、スーパーオキシドディスムターゼ、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、顆粒球コロニー刺激因子等があげられる) を含有する軟膏剤を提供する。

WO 03/000278 A1

## 明 細 書

## 軟膏剤

技術分野

本発明の目的は、化学的に修飾された生理活性ポリペプチドを含有する軟膏剤に関する。さらに、該軟膏剤の治療剤、化粧品、保湿剤としての使用に関する。

背景技術

生理活性を有するポリペプチド（以下、生理活性ポリペプチドという）は、特定の疾病に対する治療剤として有用であるが、血中に投与されると安定性が悪く、十分な薬理効果が期待できない場合が多い。例えば、分子量60,000程度以下のポリペプチドは血中に投与されても腎臓の糸球体より濾過され、大部分が尿中に排泄されるため、治療剤として用いられたとしても大きな治療効果が得られず、繰り返しの投与が必要になる場合が多い。また、他の生理活性ポリペプチドは血中に存在する加水分解酵素等によって分解され、生理活性を失うことがある。

外因性の生理活性ポリペプチドの場合には、その生理活性が疾患の治療に有効なことがあるが、そのような外因性の生理活性ポリペプチドや遺伝子組換えによって製造された生理活性ポリペプチド等は内因性の生理活性ポリペプチドと構造が異なるために、それが血中に投与された場合には免疫反応が誘発され、アナフィラキシーショック等の重篤な副作用が引き起こされる場合もあることが知られている。さらに、生理活性ポリペプチドの中にはそれが治療剤として用いられる際に、溶解性が悪い等の物性が問題になることも多い。

生理活性ポリペプチドを治療剤として用いる際のこれらの問題を解決する方法の一つとして、1分子以上の不活性型ポリマー鎖を該ポリペプチドに化学的に結合させる方法が知られている。多くの場合、ポリエチレングリコール等のポリアルキレングリコール類を該ポリペプチドに化学的に結合させることによって、該ポリペプチドに望ましい特性が付与されている。

例えば、ポリエチレングリコールで修飾されたスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) では血中の半減期が著しく延長され、作用の持続性が見出されている [ファーマシューティカル リサーチ コミュニケーション (Pharm. Research Commun.)、19巻、287頁 (1987年)]。また、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のポリエチレングリコール修飾体も知られている [ジャーナル オブ バイオケミストリー (J. Biochem.)、115巻、814頁 (1994年)]。その他にも、アスパラギナーゼ、グルタミナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ウリカーゼ等の生理活性ポリペプチドのポリエチレングリコール修飾体の例がGillian E. Francisらによってまとめられている [ファーマシューティカル バイオテクノロジー (Pharmaceutical Biotechnology)、3巻、スタビリティー オブ プロテイン ファーマシューティカルズ パート B (Stability of Protein Pharmaceuticals, PartB)、235頁 (1992年)、プレナムプレス、ニューヨーク (Plenum Press, New York)]。

生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコールで修飾することによって得られる効果としては、熱安定性が高まること [生物物理、38巻、208頁 (1998年)]、有機溶媒に可溶となること [バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications, B.B.R.C.)、122巻、845頁 (1984年)] 等も知られている。

一方、ペプチドや蛋白質とポリアルキレングリコールとの結合方法も知られている。ポリアルキレングリコールの末端にカルボン酸の活性エステル、マレイミド基、カーボネート基、塩化シアヌル、アルデヒド基、エポキシド基等を導入してポリペプチドのアミノ基やチオール基に結合する方法が知られている [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)]。これらの技術の中には、ポリペプチドまたは蛋白質の特定のアミノ酸残基に特異的にポリエチレングリコールを結合し、該ポリペプチドまたは蛋白質の生理活性を損なわずに血中安定性を向上させた例も含まれる。ポリペプチド中のアミノ酸残基特異的なポリエチレングリコール修飾の例としては、成長ホルモン放出因子 (Growth Hormone-releasing Factor) のカルボキシ末端にノルロイシンのスペーサーを介してポリエチレングリコールを結合した例 [ジャーナル オブ ペプチド

リサーチ (J. Peptide Res.)、49巻、527頁 (1997年) ]、インターロイキン-2のN末端から3番目のアミノ酸の代わりに遺伝子組換えによってシステインを導入し、この部位に特異的にポリエチレングリコールを結合した例 [バイオテクノロジー (BIO/TECHNOLOGY)、8巻、343頁 (1990年) ] 等が知られている。

前記のように、ポリアルキレングリコールによる化学修飾生理活性ポリペプチドでは、一般に静脈内投与や皮下投与によって血中持続性、安定性の向上が得られることが知られているが、その一方でポリアルキレングリコールによる化学修飾生理活性ポリペプチドが注射剤以外の投与形態に利用できる性質を有しているかは未だ十分に解明されていない。

一方、局所治療剤としては、軟膏剤、点眼剤、経鼻剤、経肺剤、点耳剤、座剤、クリーム剤、ローション剤、リニメント剤、バップ剤、バンソウ膏等が知られている。例えば、軟膏剤として生理活性ポリペプチド類を利用した例として、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) およびSODによる火傷の治療 [バイオリジカル アンド ファーマシューティカル ブレタン (Biological & Pharmaceutical Bulletin)、16 (11) 巻、1146頁 (1993年) ] が知られている。

また、臨床において、インターフェロン類を局所治療剤としての軟膏剤として利用することが試みられている。即ち、帯状疱疹、口唇ヘルペス、角膜ヘルペス、伝染性軟疣腫、水痘、口内炎等のウイルス性の皮膚疾患や、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、網膜中心静脈閉塞症、血管新生由来の緑内障等の眼疾患、皮膚の腫瘍や疣に対してインターフェロン類の軟膏剤が有用であることが知られている。具体的には、インターフェロン- $\alpha$ による単純ヘルペス-1型ウイルスの治療 [ダーマトロジー (Dermatology)、184 (1) 巻、40頁 (1992年)、アクタ ビロロジカ (Acta Virologica)、39 (3) 巻、125頁 (1995年) ]、白血球インターフェロンによる潰瘍治療 [インターナショナル ジャーナル オブ クリニカル ファーマコロジー、セラピー アンド トキシコロジー (International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy & Toxicology)、19 (10) 巻、450頁 (1981年) ] 等が知られている。また、特定の血管新生による視力障害の治療剤において、インターフェロン類等の軟膏剤の利用も試みられている [特開平9-255555、日本眼科学会雑



誌、99巻、571頁（1995年）]。

これらの治療方法では病巣部位への直接の効果が得られ、著しい治療効果が認められてはいるものの、生理活性ポリペプチドを含有するこれらの局所治療剤中の生理活性ポリペプチドの安定性に関しては、何ら知見が得られていない。

我々は軟膏剤中における活性成分としての生理活性ポリペプチドの安定化について鋭意検討した結果、生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコールで化学修飾することにより、生理活性ポリペプチドが格段に安定化され、高い生理活性が維持されることを見出した。

#### 発明の開示

本発明の目的は、生理活性ポリペプチドに比べて軟膏中での安定性に優れた生理活性ポリペプチド誘導体を含有する軟膏剤を提供することにある。

本発明者は前記の目的を達成するために、インターフェロンに代表される生理活性ポリペプチドを化学的に修飾、例えばポリアルキレングリコール類で修飾したところ、当該ポリエチレングリコール類で修飾された生理活性ポリペプチドは該生理活性を維持し、未修飾の生理活性ポリペプチドに比べて軟膏中での安定性に優れていることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は化学的に修飾された生理活性ポリペプチド（以下、化学修飾ポリペプチドということもある）を含有する軟膏剤に関する。

また、本発明は、上記の化学的に修飾された生理活性ポリペプチドを含有する化粧用軟膏剤および保湿用軟膏剤に関する。

さらに本発明は、軟膏剤、化粧用軟膏剤または保湿用軟膏剤の製造のための化学的に修飾された生理活性ポリペプチドの使用に関する。

また、本発明は、生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコール類で修飾することを特徴とする該生理活性ポリペプチドの軟膏剤中での安定化方法に関する。さらに本発明は、生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコール類で修飾することを特徴とする該生理活性ポリペプチドの軟膏剤中での活性を維持する方法に関する。

さらに本発明は、化学的に修飾された生理活性ポリペプチドと軟膏基剤等を含む組合物に関する。

以下に、本発明を詳細に説明する。

化学的に修飾された生理活性ポリペプチドとしては、例えば少なくとも1個のポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチドがあげられる。

生理活性ポリペプチドは、生理活性または薬理活性を有するポリペプチドであればいかなるポリペプチドでもよい。例えば、アスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Dismutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン1~18 (Interleukin 1~18)、インターフェロン- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ )、インターフェロン- $\beta$  (Interferon- $\beta$ )、インターフェロン- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )、インターフェロン- $\omega$  (Interferon- $\omega$ )、インターフェロン- $\tau$  (Interferon- $\tau$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ蛋白質 (Klotho)、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子1~19 (Fibroblast Growth Factor 1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン様成長因子1 (Insulin-like Growth Factor 1)、オステオジェニックプロテイン1 (Osteogenic Protein 1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon Like Peptide)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン

(Endostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor)、抗体もしくはそのフラグメント、融合抗体等の生理活性を有するポリペプチドおよびそれらのアミノ酸置換体、アミノ酸欠失体、糖鎖付加体、糖鎖欠失体、部分ペプチド等をあげることができる。より好ましい生理活性ポリペプチドとしては、インターフェロニン- $\beta$ 、インターフェロニン- $\alpha$ 、インターフェロニン- $\gamma$ 等のインターフェロン類、スーパーオキシドディスムターゼ活性を有する生理活性ポリペプチドがあげられる。

これらの生理活性ポリペプチドは動物臓器や組織から抽出する方法でも得られるが、通常のペプチド合成法、あるいは遺伝子組換え法で調製することによっても得ることができる。さらに、市販の生理活性ポリペプチドも用いることができる。化学修飾に使用する生理活性ポリペプチドとしては粗精製物を用いることもできるし、あるいはゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、抽出等の精製法により化学修飾に適した純度に精製したものを用いることもできる。

これらの生理活性ポリペプチドはリン酸緩衝液、ほう酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等の緩衝液中、水もしくはN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ジオキサン、テトラヒドロフラン等の適当な有機溶媒中、またはこれらの有機溶媒と水との混合溶媒中で調製され、また化学修飾反応に用いられる。

化学的に修飾された生理活性ポリペプチドは、本発明の目的を達成できるものであればいかなるものでもよく、例えばポリエチレングリコールもしくはその誘導体、ポリプロピレングリコールもしくはその誘導体、ポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール共重合体もしくはその誘導体等のポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチドが好ましい。ポリアルキレングリコール類としては直鎖型の構造のもの、2本以上のポリアルキレングリコールが結合した分岐型の構造のものを用いることができ、平均分子量が約1,000~1,000,000のものが好ましく、平均分子量が500~1000,000のものがより好ましい。

ポリアルキレングリコール類は市販のものを用いることもできるし、既知の方

法に準じて調製することもできる。ポリアルキレングリコール類の調製方法としては、Samuel Zalipskyの総説[バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)]等 に示された方法またはそれに準じた方法を用いることができる。

ポリアルキレングリコール類と生理活性ポリペプチドとの反応は、ポリアルキレングリコール類を生理活性ポリペプチド 1 モルあたり 1~1000モル程度、より好ましくは 1~50モル程度用いて反応させることによって行われる。ポリアルキレングリコール類の生理活性ポリペプチドへの修飾の度合いは生理活性ポリペプチドに対するポリアルキレングリコール類のモル比、反応温度、pH、反応時間等を調節することによって、任意に選択することができる。また、反応に使用する溶媒は反応を妨害しないものであればいずれでもよく、例えばりん酸緩衝液、ほう酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、炭酸水素ナトリウム水溶液、酢酸ナトリウム緩衝液、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、メタノール、アセトニトリル、ジオキサン等、あらゆるものから選択することができる。反応温度、反応時間、pH等の反応条件は生理活性ポリペプチドの活性が損なわれない条件であればいずれでもよく、例えば反応温度は 0~50℃、反応時間は 10分~100時間、pHは 4~10が好ましい。

ポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチドの精製は常法に従って、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外濾過等により行うことができる。合成または精製された生理活性ポリペプチド、あるいはポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチドが当該ポリペプチドの構造を有するものであることの確認は、質量分析、核磁気共鳴 (NMR) およびアミノ酸組成のアミノ酸分析計による分析により、またアミノ酸配列を気相プロテインシーケンサーによりエドマン分解して得られたフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸を逆相HPLC分析すること等により行うことができる。

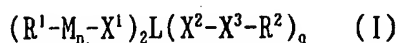
顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、エリスロポエチン、インターフェロン、インターロイキン等の遊離システイン残基を有する天然型または遺伝子組み換え

型の生理活性ポリペプチドはポリアルキレングリコール類で部位特異的に修飾することもできる。

本発明の好ましい1つの態様では、化学的に修飾された生理活性ポリペプチドが、特開平11-310600に記載のポリエチレングリコールで修飾された生理活性ポリペプチド、WO99/55377に記載のポリエチレングリコールで修飾された生理活性ポリペプチド、WO00/23114に記載のポリエチレングリコールで修飾された生理活性ポリペプチド、特表昭62-503171、WO87/00056、US4766106、US4917888もしくはUS4863727に記載のポリエチレングリコールで修飾された生理活性ポリペプチド、または特開平6-192300もしくはEP593868A1に記載のポリエチレングリコールで修飾された生理活性ポリペプチドである。

本発明の別の好ましい1つの態様では、生理活性ポリペプチドを化学的に修飾するポリアルキレングリコール類が、平面構造以外の環状構造を含有する基に2本の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつ生理活性ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類である。

中でも、生理活性ポリペプチドを化学的に修飾するポリアルキレングリコール類が、式(I)



{式中、Lは平面構造以外の環状構造を含有する3～5分岐が可能な基を表し、MはOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>、OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>、OCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>、(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub> (式中、rおよびsは同一または異なって、任意の正の整数を表す) または (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>ra</sub>-[OCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>]<sub>sa</sub> (式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である) を表し、  
nは任意の正の整数を表し、  
qは1～3の整数を表し、

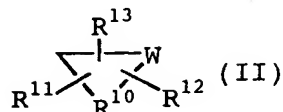
$R^1$ は水素原子、低級アルキルまたは低級アルカノイルを表し、  
 $R^2$ はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表し、  
 $X^1$ は結合、O、S、アルキレン、 $O(CH_2)_{1a}$ （式中、 $1a$ は1～8の整数を表す）、 $(CH_2)_{1b}O$ （式中、 $1b$ は前記 $1a$ と同義である）、 $NR^3$ （式中、 $R^3$ は水素原子または低級アルキルを表す）、 $R^4-NH-C(=O)-R^5$  [式中、 $R^4$ は結合、アルキレンまたは $O(CH_2)_{1c}$ （式中、 $1c$ は前記 $1a$ と同義である）を表し、 $R^5$ は結合、アルキレンまたは $OR^{5a}$ （式中、 $R^{5a}$ は結合またはアルキレンを表す）を表す]、 $R^6-C(=O)-NH-R^7$  [式中、 $R^6$ は結合、アルキレンまたは $R^{6a}O$ （式中、 $R^{6a}$ は前記 $R^{5a}$ と同義である）を表し、 $R^7$ は結合、アルキレンまたは $(CH_2)_{1d}O$ （式中、 $1d$ は前記 $1a$ と同義である）を表す]、 $R^8-C(=O)-O$ （式中、 $R^8$ は前記 $R^{5a}$ と同義である）または $O-C(=O)-R^9$ （式中、 $R^9$ は前記 $R^{5a}$ と同義である）を表し、  
 $X^2$ は結合、Oまたは $(CH_2)_{1e}O$ （式中、 $1e$ は前記 $1a$ と同義である）を表し、  
 $X^3$ は結合またはアルキレンを表し、2つの $R^1-M_n-X^1$ および1つ～3つの $X^2-X^3-R^2$ はそれぞれ同一でも異なってもよい} で表される分岐型ポリアルキレングリコール類であるのが好ましい。

式 (I) において、 $q$ が1である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましく、さらに $n$ が10～100,000であり、 $r$ および $s$ ならびに $ra$ および $sa$ が同一または異なって、1～100,000である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

式 (I) において、 $R^2$ が水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィドま

たはアジドである分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

また、式 (I) においては、Lが式(II)



[式中、 $\text{R}^{10}$ は $(\text{CH}_2)_u$  (式中、 $u$ は1~10の整数を表す) または $\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{ua}$  (式中、 $ua$ は0~8の整数を表す) を表し、

$\text{R}^{11}$ 、 $\text{R}^{12}$ および $\text{R}^{13}$ は同一または異なって、水素原子、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、シアノまたはホルミルを表し、

WはO、S、 $\text{CH}_2$ または $\text{NR}^{14}$  (式中、 $\text{R}^{14}$ は水素原子または低級アルキルを表す) を表す] で表される化合物から水素原子を3~5個除いた基である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。中でも、Wが $\text{CH}_2$ であり、かつ $u$ が4である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

本発明の好ましいさらに別の態様では、生理活性ポリペプチドを化学的に修飾するポリアルキレングリコール類が、1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本以上結合し、かつ、生理活性ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類である。

中でも、生理活性ポリペプチドを化学的に修飾するポリアルキレングリコール類が、式(Ix)



[式中、 $\text{Lx}$ は4以上分岐が可能な基を表し、

$\text{Mx}$ は $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{rx}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_{sx}$  (式中、 $rx$ および $sx$ は同一または異なって、任意の正の整数を表す) または

$(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{\text{rax}}\text{[OCH(CH}_3\text{)CH}_2\text{]}_{\text{sax}}$  (式中、 $\text{rax}$ および $\text{sax}$ はそれぞれ前記 $\text{rx}$ および $\text{sx}$ と同義である)を表し、

$\text{nx}$ は任意の正の整数を表し、 $\text{mx}$ は3以上の整数を表し、 $\text{qx}$ は1~3の整数を表し、

$\text{R}^{1\text{x}}$ は水素原子、低級アルキルまたは低級アルカノイルを表し、

$\text{R}^{2\text{x}}$ はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表し、

$\text{X}^{1\text{x}}$ は結合、O、S、アルキレン、 $(\text{OCH}_2)_{\text{tax}}$  (式中、 $\text{tax}$ は1~8の整数を表す)、 $(\text{CH}_2)_{\text{tbx}}\text{O}$  (式中、 $\text{tbx}$ は前記 $\text{tax}$ と同義である)、 $\text{NR}^{3\text{x}}$  (式中、 $\text{R}^{3\text{x}}$ は水素原子または低級アルキルを表す)、 $\text{R}^{4\text{x}}\text{-NH-C(=O)-R}^{5\text{x}}$  [式中、 $\text{R}^{4\text{x}}$ は結合、アルキレンまたは $\text{O(CH}_2)_{\text{tcx}}$  (式中、 $\text{tcx}$ は前記 $\text{tax}$ と同義である)を表し、 $\text{R}^{5\text{x}}$ は結合、アルキレンまたは $\text{OR}^{5\text{ax}}$  (式中、 $\text{R}^{5\text{ax}}$ は結合またはアルキレンを表す)を表す]、 $\text{R}^{6\text{x}}\text{-C(=O)-NH-R}^{7\text{x}}$  [式中、 $\text{R}^{6\text{x}}$ は結合、アルキレンまたは $\text{R}^{6\text{ax}}\text{O}$  (式中、 $\text{R}^{6\text{ax}}$ は前記 $\text{R}^{5\text{ax}}$ と同義である)を表し、 $\text{R}^{7\text{x}}$ は結合、アルキレンまたは $(\text{CH}_2)_{\text{tdx}}\text{O}$  (式中、 $\text{tdx}$ は前記 $\text{tax}$ と同義である)を表す]、 $\text{R}^{8\text{x}}\text{-C(=O)-O}$  (式中、 $\text{R}^{8\text{x}}$ は前記 $\text{R}^{5\text{ax}}$ と同義である)または $\text{O-C(=O)-R}^{9\text{x}}$  (式中、 $\text{R}^{9\text{x}}$ は前記 $\text{R}^{5\text{ax}}$ と同義である)を表し、

$\text{X}^{2\text{x}}$ は結合、Oまたは $(\text{CH}_2)_{\text{tcx}}\text{O}$  (式中、 $\text{tcx}$ は前記 $\text{tax}$ と同義である)を表し、

$\text{X}^{3\text{x}}$ は結合またはアルキレンを表し、

3つ以上の $\text{R}^{1\text{x}}\text{-(Mx)}_{\text{nx}}\text{-X}^{1\text{x}}$ はそれぞれ同一でも異なってもよく、 $\text{X}^{2\text{x}}\text{-X}^{3\text{x}}\text{-R}^{2\text{x}}$ が2または3個存在する場合 ( $\text{qx}$ が2または3である場合) には、それらは同一でも異なってもよい} で表わされる分岐型ポリアルキレングリコール類であるのが好ましい。

式(Ix)において、 $\text{qx}$ が1である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましく、また $\text{mx}$ が3または4である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。さらに、 $\text{nx}$ が10~100,000であり、 $\text{rx}$ および $\text{sx}$ ならびに $\text{rax}$ および $\text{sax}$ が同一または異なって、1~100,000である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

式(Ix)において、 $\text{R}^{2\text{x}}$ が水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホン、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アル



カノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィドまたはアジドである分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

また、上記の分岐型ポリアルキレングリコール類の中で、分子量が500～1,000,000である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

式(Ix)において、Lxがトリシンから水素原子4個以上を除いた基、シキミ酸から水素原子4個以上を除いた基、キナ酸から水素原子4個以上を除いた基、エリスリトールから水素原子4個以上を除いた基、ペンタエリスリトールから水素原子4個以上を除いた基およびグルコースから水素原子4個以上を除いた基から選ばれる基である分岐型ポリアルキレングリコール類が好ましい。

以下、式(I)および式(Ix)で表される化合物をそれぞれ化合物(I)および化合物(Ix)という。他の式番号の化合物についても同様である。

式(I)の各基の定義において、低級アルキルおよび低級アルカノイルの低級アルキル部分は、直鎖状または分岐状の炭素数1～8の、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等を包含する。アルキレンは、炭素数1～8の、例えばメチレン、エチレン、n-プロピレン、イソプロピレン、n-ブチレン、イソブチレン、sec-ブチレン、tert-ブチレン、ペンチレン、ネオペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン等を包含する。

式(I)において、Mは $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 、 $\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ 、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$  (式中、rおよびsは同一または異なって、任意の正の整数を表す) または  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{sa}$  (式中、raおよびsaはそれぞれ前記rおよびsと同義である) を表し、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_s$  (式中、rおよびsはそれぞれ前記と同義である) または  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{ra}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2]_{sa}$  (式中、raお

よびsaはそれぞれ前記と同義である)である場合、rおよびs並びにraおよびsaは、好ましくは1~100,000であり、さらに好ましくは1~1,000である。

式(I)において、nは任意の正の整数を表し、好ましくは10~100,000であり、さらに好ましくは100~1,000である。

式(I)において、 $M_n$ で表されるポリアルキレングリコール部分の平均分子量は、約1,000~1,000,000が好ましく、5,000~100,000がさらに好ましい。 $M_n$ が $-(OCH_2CH_2)_n-$ である場合、原料となるポリエチレングリコール類は $M_w$  (重量平均分子量) /  $M_n$  (数平均分子量) で表される分子量分布が1.1以下の単分散のものが望ましく、平均分子量30,000以下であれば市販のものを用いることができる。例えば、平均分子量が2,000、5,000、10,000、12,000、20,000等のモノメトキシポリエチレングリコールが利用できる。

式(I)において開示される、平面構造以外の環状構造を含有する基に2本の1本鎖ポリアルキレングリコール類が結合し、かつ生理活性ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類、式(I)で表される分岐型ポリアルキレングリコール類の分子量は、500~1,000,000であることが望ましい。

式(I)において、qは1~3の整数を表し、好ましくは1である。

式(I)において、Lは平面構造以外の環状構造を含有する3~5分岐が可能な基であり、環状構造上の置換基として、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、シアノまたはホルミル等を有していてもよい。ここで、低級アルキルおよび低級アルコキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、置換低級アルキルにおける置換基としては、水酸基、アミノ、低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイル、低級アルキルカルバモイルオキシ等があげられる。低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級ア

ルキルカルバモイルおよび低級アルキルカルバモイルオキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。Lとしては、例えば、シクロヘキサン類、シクロヘキセン類、単糖類等から水素原子3～5個除いた基があげられる。上記シクロヘキサン類、シクロヘキセン類、単糖類の具体例としては、シクロヘキサントリカルボン酸、シクロヘキサントリオール、1,3,5-トリメチル-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 (Kemp's triacid)、キナ酸 (Quinic acid)、ジアミノシクロヘキサン、2,4,10-トリオキサアダマンタン、イノシトール、シキミ酸 (Shikimic acid)、D,L-ソルビトール、リボース、エリスリトール等およびそれらの立体異性体があげられる。

L部分の構造の構築は市販品の化合物をそのまま利用するか、一般の有機合成法によってポリアルキレングリコール類の結合に適した形に誘導体化して利用するか、あるいは官能基の保護を行った後に利用して行うことができる [日本化学会編、実験化学講座 第4版 (1992年)、有機合成I～V、丸善、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等]。

上記で例示した以外のシクロヘキサン類は、例えば木檜ら [大有機化学、第6巻、183頁 (1958年)、朝倉書店] またはG. E. McCaslandとE. Clide Horswill [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイティ (Journal of American Chemical Society)、76巻、2373頁 (1954年)] の方法等に従って合成することができる。

また、例えば、ベンゼン環を有する化合物をS. IsodaとH. Yamaguchiの方法 [ケミカル アンド ファーマシューティカル ブルチン (Chem. Pharm. Bull.)、28 (8) 巻、2337頁 (1980年)]、K. PrasadとO. Repicの方法 [テトラヘドロンのレターズ (Tetrahedron Letters)、25 (23) 巻、2435頁 (1984年)] 等で平面構造以外の環状構造を有する3～5分岐が可能な化合物に変換してL部分の構造の構築を行うこともできる。

化合物 (I) において、X<sup>1</sup>を介したポリアルキレングリコール類とLとの結合は通常の有機合成法で知られている反応を容易に組み合わせて行うことができる。

[日本化学会編、実験化学講座 第4版、19-23頁（1992年）、有機合成I～V、丸善]。

式 (I) において、 $R^2$ はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表す。

すなわち、上記反応性を有する基としては、ポリペプチド中の、リジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン等の各側鎖、N末端アミノ基、C末端カルボキシル基のいずれかと反応性を有する基が包含され、例えば水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィド、アジド等があげられる。

上記の各基の定義において、低級アルコキシカルボニルオキシ、ハロゲン化低級アルキル、低級アルカノイルオキシおよび低級アルカノイルオキシカルボニルの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。アリールオキシカルボニル、アリールオキシカルボニルオキシおよびアリールジスルフィドのアリール部分としては、炭素数6～14の、例えばフェニル、ナフチル、ビフェニル、アントリル等があげられる。アロイルオキシカルボニルのアロイル部分としては、炭素数7～13の、例えばベンゾイル、ナフトイル、フタロイル等があげられる。ハロゲン化カルボニルおよびハロゲン化低級アルキルのハロゲン部分としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子があげられる。

置換低級アルコキシカルボニルオキシにおける置換基としては、同一または異

なって置換数1~3の、例えば、水酸基、カルボキシ、ハロゲン等があげられる。ここで、ハロゲンは、前記と同義である。

置換アリールオキシカルボニル、置換アリールオキシカルボニルオキシ、置換アリールジスルフィドおよび置換アロイルオキシカルボニルにおける置換基としては、同一または異なって置換数1~3の、例えば水酸基、カルボキシ、ハロゲン、シアノ、低級アルキル等があげられる。ここで、ハロゲンおよび低級アルキルは、それぞれ前記と同義である。

$R^2$ で表される基は、L部分の構造を構築する原料に含まれていてもよいし、該原料化合物中の必要な官能基をあらかじめ適当な保護基〔プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等〕で保護し、 $X^1$ を介してポリアルキレングリコール類をLに結合して分岐させた後に脱保護、さらには必要により変換して形成してもよい。さらにポリアルキレングリコール類を $X^1$ を介してLから分岐させた後に、通常の有機合成法によってLに必要により $X^2$ または $X^3$ を介して前記 $R^2$ を導入することもできる。

より具体的には、例えば以下の製造法で本発明の式(I)で表される分岐型ポリアルキレングリコール類を製造することができるが、製造法はこれらに限定されるものではない。

製造法1：化合物(I)において $X^1$ が結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{1a}$ 、または $(CH_2)_{1b}O$ である化合物の製造

化合物(I)のうち、 $X^1$ が結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{1a}$  (式中、 $1a$ は前記と同義である)、または $(CH_2)_{1b}O$  (式中、 $1b$ は前記と同義である)である化合物(Ia)は、例えば以下の方法により製造することができる。

水酸基を2個所以上有する環状ポリオール類 (以下、本明細書において環状ポリオール類というときは、環状構造上の置換基として水酸基以外に、ヒドロキシ低級アルキル等を有する化合物も包含する) を、無水状態でN,N-ジメチルホルムア

ミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、ポリアルキレングリコールまたはそのモノアルキルエーテルもしくはモノカルボン酸エステル（以下、これらをまとめてポリアルキレングリコール類Aという）のハロゲン化物もしくはトシル化物を1~3モル相当加えて、-20~150℃で1時間~10日間反応させて、2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物が得られる。

環状ポリオール類はシクロヘキサントリオール、キナ酸、シキミ酸、グルコース、ソルビトール、リボース、エリスリトール等の市販の化合物、または市販の化合物から導かれる化合物から選ばれる。市販の化合物から導かれる化合物としては、例えば、シクロヘキサントリカルボン酸やKemp's triacid等から選ばれる環状ポリカルボン酸を通常の有機合成法〔日本化学会編、実験化学講座 第4版、19~21巻（1992年）、丸善〕に従って適当な還元剤で還元することによって得られる環状ポリオール類があげられる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

環状ポリオール類中の水酸基の配置は何れでもよく、反応に不必要な官能基を文献〔プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等〕に記載の方法によって適当に保護、あるいは誘導体化してから、反応に使用することができる。

ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物およびトシル化物はSamuel Zalipskyの総括〔バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁（1995年）〕等の開示された各種の方法で容易に製造することができる。結合に使用するポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物およびトシル化物としては分子量分布が均一であれば（好ましくは、 $M_w/M_n$ が1.1以下）いかなる平均分子量のものも用いられる。

得られた2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物はそのままの純度、あるいはイオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で任意の純度の2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類に精製、単離して、次のステップに用いることができる。ここまでの工程で、化合物(Ia)のうち、 $R^2$ が水酸基である化合物(Iaj)のいくつかが得られる。

一方、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類とポリアルキレングリコール類Aを使用することによっても目的の2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を調製することができる。この場合、1~3モル相当のポリアルキレングリコール類AをN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1モル相当の環状ポリハライド類または環状ポリトシル類を加えて、-20~150℃で1時間~10日間反応させて目的物が得られる。

環状ポリハライド類は市販の化合物であるか、前記環状ポリオール類をハロゲン化合物に変換〔日本化学会編、実験化学講座、第4版、19巻（1992年）、丸善〕して得られる。環状ポリトシル類は環状ポリオール類をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン、カリウムナフタレン等の適当な塩基の存在下、水酸基当たり1~3モル相当のハロゲン化トシルを加えて、-20~150℃で1時間~数日間反応させることで得ることができる。

次に、得られた2本鎖分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物または精製化合物に、 $R^2$ を導入する。 $R^2$ としては、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類に結合した後、環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類に残存している官能基をそのまま利用するか、あるいはあらかじめ環状ポリオール類に結合している官能基を保護しておき、ポリアルキ

レングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合後、官能基の保護基を除去して得られる基を利用してもよい。この場合、前記環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類中の1個所以上の水酸基、または他の官能基を適当な保護基で保護した後、前記と同様の方法で残りの水酸基、ハロゲンまたはトシル基部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を導入し、2本のポリアルキレングリコールが結合した化合物を合成し、保護基を除去した官能基をそのまま利用するか、あるいは該官能基の少なくとも一つを後述する方法に従って $R^2$ に変換する。ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合する前、もしくは結合した後に環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類に存在する官能基としては、水酸基の他に、カルボキシ、アミノ、ハロゲン、シアノ、ホルミル、カルボニル等がある。適当な官能基の保護基としては水酸基の場合、ベンジル、tert-ブチル、アセチル、ベンジルオキシカルボニル、tert-ブチルオキシカルボニル、ジメチルtert-ブチルシリル、ジフェニルtert-ブチルシリル、トリメチルシリル、トリフェニルシリル、トシル、テトラヒドロピラニル等があげられ、アミノの場合、メチル、エチル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、ニトロベンジルオキシカルボニル、N-フタルイミド、アセチル、tert-ブチルオキシカルボニル等があげられ、カルボキシの場合、ベンジル、メチル、エチル、tert-ブチル、9-フルオレニルメチル、メトキシエトキシメチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、シンナモイル、アリル、ニトロフェニル等があげられ、ホルミルの場合、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、ジベンジルアセタール、1,3-ジオキサニル等があげられる[プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年)]。

あらかじめ存在する官能基をそのまま、または保護、脱保護して $R^2$ として利用でき、L部分の構造を構築する原料となる環状ポリオール類、環状ポリハライド類または環状ポリトシル類の具体例としては、シキミ酸、キナ酸、Kemp's triacid等

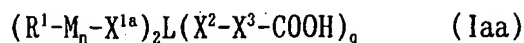


があげられる。

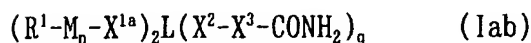
化合物(I)のうち、Lを含む化合物に新たに置換基 $R^2$ を導入して得られる化合物の場合、例えば以下の製造方法で容易に製造を行うことができる。

#### 製造法 1 - 1

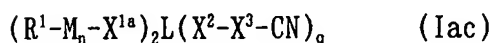
化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がカルボキシである式(Iaa)



(式中、 $X^{1a}$ は結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{1a}$ 、または $(CH_2)_{1b}O$ を表し、 $R^1$ 、L、M、n、q、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物、 $R^2$ がカルバモイルである式(Iab)



(式中、 $R^1$ 、L、M、n、q、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物、 $R^2$ がシアノである式(Iac)



(式中、 $R^1$ 、L、M、n、q、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は例えば以下のように合成することができる。

化合物(Iaa)、化合物(Iab)および化合物(Iac)は、環状ポリオール類を用いて、例えば製造法 1 に従って得られる化合物(Ia)のうち、 $R^2$ として水酸基を有する化合物(Iaj)を含む反応混合物または精製化合物を水、塩化メチレン、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒中、触媒量または1~20%の塩基存在下、1~30モル相当のアクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等と、-20~150°Cで1時間~数日間反応させて得ることができる。塩基としては、水酸化カリウム、水酸

化ナトリウム、水素化ナトリウム等があげられる。

また、化合物(Iaa)は、例えば製造法1で得られる化合物(Iaj)を含む反応混合物または精製化合物を無水状態でN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モル相当の $\alpha$ -ハロゲン化酢酸エステルと、-20~150°Cで1時間~数日間反応させた後、加水分解して得ることもできる。

さらに、化合物(Iaa)は、例えば製造法1で得られる化合物(Iaj)をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モルのスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、-20~100°Cで1時間~10日間反応させて活性化し、その後、 $\gamma$ -アミノ酪酸、グリシン、 $\beta$ -アラニン等のアミノ酸またはその誘導体と反応させることによって得られる。

また、製造法1で得られる化合物(Iaj)を前記同様の塩基存在下、無水コハク酸、無水グルタル酸等の酸無水物と反応させることによって化合物(Iaa)を製造することができる。

また、化合物(Iaa)は、例えば環状ポリハライド類を用いて製造法1に従って、化合物(Ia)のうち $R^2$ がハロゲン化低級アルキルである化合物(Iai)を製造した後、ヒドロキシカルボン酸エステル、マロン酸エステル、 $\gamma$ -アミノ酪酸のエステル体、 $\beta$ -アラニンのエステル体、グリシンのエステル体等をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、化合物(Iai)を加え、-20~150°Cで1時間~数日間反応を行った後、加水分解して得ることもできる。

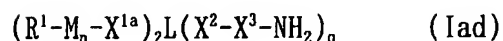
さらに、化合物(Iaa)は、例えば前記環状ポリオール類もしくは環状ポリハライド類の一個所以上の水酸基またはハロゲンを、あらかじめカルボン酸あるいはカ

ルボン酸の保護体を含む残基で置換し、これを用いて製造法 1 で示した方法で環状ポリオール類もしくは環状ポリハライド類の残りの2個所の水酸基またはハロゲンをポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物で置換することで得ることもできる。この場合、カルボン酸またはカルボン酸の保護体を含む残基の導入は、前記と同様に行うことができる。カルボン酸を保護した場合には、ポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を環状ポリオール類もしくは環状ポリハライド類に導入した後に脱保護して遊離カルボン酸を生成させる。

カルボン酸に変換された化合物は、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で、任意の純度で精製、単離することができる。

## 製造法 1 - 2

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がアミノである式(Iad)



(式中、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば製造法 1 - 1 で得られる化合物(Iac)に適当な還元剤を作用させて得られる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

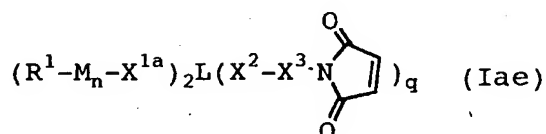
また、化合物(Iad)は、例えば製造法 1 で得られる化合物(Iai)または化合物(Iai)中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物に5当量～過剰量のエチレンジアミン、プロピレンジアミン等のジアミン類を適当な塩基存在下で反応させることによって得られる。

さらに、製造法 1 - 1 で示したのと同様に、化合物(Iad)は、例えば化合物(Iaj)をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化

亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1～50モルのスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、-20～100℃で1時間～10日間反応させて活性化し、その後、1当量～過剰量のエチレンジアミンやプロピレンジアミン等のジアミン類と適当な塩基存在下で反応させることによって得られる。

また、化合物(Iad)は、例えば製造法1で示した方法に準じ、あらかじめLを形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のアミノまたはアミノの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法によっても得られる。

化合物(Ia)のうち、R<sup>2</sup>がマレイミドである式(Iae)



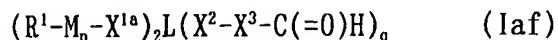
(式中、R<sup>1</sup>、L、M、n、q、X<sup>1a</sup>、X<sup>2</sup>およびX<sup>3</sup>はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えばOskar Kellerらの方法[ヘルベチカ キミカ アクタ(Helv. Chim. Acta)、58巻、531頁(1975年)]またはTimothy P. Koganらの方法[シンセティック コミュニケーション(Synthetic Commun.)、22巻、2417頁(1992年)]に従い、化合物(Iad)とN-アルコキシカルボニルマレイミドとを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で反応させることで得ることができる。N-アルコキシカルボニルマレイミドとしてはN-エトキシカルボニルマレイミドやN-メトキシカルボニルマレイミドを用いることができる。

また、化合物(Iae)は、例えば製造法1で示した方法に準じ、あらかじめLを形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のマレイミドを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法によっても得られる。

化合物(Iad)、化合物(Iae)およびそれらの合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものとして単離、精製することができる。

### 製造法 1 - 3

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がホルミルである式(Iaf)



(式中、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば製造法 1 で得られる化合物(Ia)のうち $R^2$ としてヒドロキシメチルを有する化合物(Iag)を適当な酸化剤で酸化することで得られる。酸化剤としては塩化クロム酸ピリジニウム、クロム酸、銀イオン、ジメチルスルホキシド等があげられる。また、化合物(Iaa)を前記と同様に適当な還元剤で還元することによっても得ることができる。

また、例えば製造法 1 で得られる化合物(Iaj)、化合物(Iai)または化合物(Iai)中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物にアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール、ハロゲン化エチルアセタール、ハロゲン化メチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

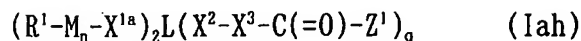
同様にして、製造法 1 で得られる化合物(Iaj)を用い、製造法 1 - 1 で示した方法に準じて水酸基を活性化し、続いてアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

また、化合物(Iaf)は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ $L$ を形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のアルデヒド、あるいはアルデヒドの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法でも得られる。

化合物(Iaf)およびその合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものとして単離、精製することができる。

#### 製造法 1 - 4

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がハロゲン化カルボニルである式(Iah)

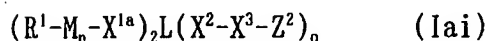


(式中、 $Z^1$ はハロゲンを表し、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば $R^2$ がカルボキシである化合物(Iaa)をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、 $0\sim 150^\circ\text{C}$ で1~24時間加熱することによって得られる。

ハロゲン化カルボニルにおけるハロゲンは前記ハロゲンと同義である。

#### 製造法 1 - 5

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がハロゲン化低級アルキルである式(Iai)



(式中、 $Z^2$ はハロゲン化低級アルキルを表し、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば $R^2$ が水酸基である化合物(Iaj)をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、 $0\sim 150^\circ\text{C}$ で1~24時間加熱することによって得られる。ハロゲン化低級アルキルにおけるハロゲンおよび低級アルキル部分はそれぞれ前記と同義である。

また、化合物(Iai)は、例えば製造法 1 で得られる化合物(Iaj)または $R^2$ がアミノで

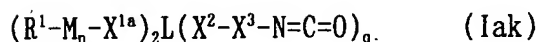
ある化合物(Iad)に、前記同様適当な塩基存在下、5当量～過剰量のジブロモエタンやジブロモプロパン等のジハロゲン化アルキル類を反応させることによって得られる。

さらに、化合物(Iai)は、例えば前記製造法1で示した方法に準じ、あらかじめLを形成させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上のハロゲン化低級アルキルを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を2個所置換させる方法によっても得られる。

化合物(Iai)およびその合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものとして単離、精製することができる。

#### 製造法1-6

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がイソシアナートである式(Iak)

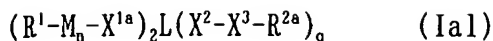


(式中、 $R^1$ 、L、M、n、q、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば、化合物(Iad)をトルエン、テトラヒドロフラン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、ホスゲンまたは塩化オキサリルと0～150℃で1～24時間反応させるか、N,N'-カルボニルジイミダゾールと反応させた後に室温で分解させて得られる。

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がイソチオシアナートである化合物(Iap)はホスゲンの代わりにチオホスゲンを用いる以外は上記の方法に従って製造することができる。

#### 製造法1-7

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルである式(Ial)

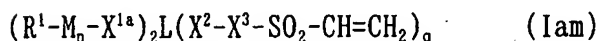


(式中、 $R^{2a}$ はスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルを表し、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、通常のエステル合成方法に従って製造することができる。例えば、化合物(Iaa)1モルに対し、N-ヒドロキシスクシンイミド、置換もしくは非置換のヒドロキシアリール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたはN-ヒドロキシフタルイミド1~10モルを、1~10モルのN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤存在下、ジメチルホルムアミド、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中、-20~100°Cで1~24時間反応させることによって目的物を得ることができる。より詳しくは、A. Fradetら [ポリマー ブルチン (Polym. Bull.)、4巻、205頁 (1981年)]、またはK. Geckelerら [ポリマー ブルチン (Polym. Bull.)、1巻、691頁 (1979年)] によるポリアルキレングリコールの末端にカルボキシル基を導入する方法、カルボキシメチルポリアルキレングリコールのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの製造方法等に準じて得ることができる。

ここで、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルは前記と同義である。アリールは前記と同義であり、置換アリールの置換基は、置換アリールオキシカルボニル、置換アリールオキシカルボニルオキシ、置換アリールジスルフィドおよび置換アロイルオキシカルボニルにおける置換基と同義である。

#### 製造法 1 - 8

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ がビニルスルホンニルである式(Iam)



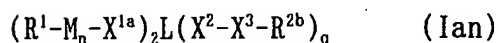
(式中、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば化合物(Iaj)を用いてMargherita Morpurgoらの方法 [バイオ



コンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、7巻、363頁 (1996年) ]  
で製造することができる。

#### 製造法 1 - 9

化合物(Ia)のうち、 $R^2$ が置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ  
または置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである式(Ian)



(式中、 $R^{2b}$ は置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換  
もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを表し、 $R^1$ 、 $L$ 、 $M$ 、 $n$ 、 $q$ 、  
 $X^{1a}$ 、 $X^2$ および $X^3$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えばTalia  
MironとMeir Wilchekの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate  
Chem.)、4巻、568頁 (1993年) ] に準じて、 $R^2$ が水酸基である化合物 (Iaj) と  
過剰量のp-ニトロフェニルクロロホルメート、エチルクロロホルメート等とをジ  
メチルアミノピリジン、トリエチルアミン等の塩基存在下で反応させることで得  
られる。

また、化合物(Ian)は、例えば製造法 1 で示した方法に準じ、あらかじめ $L$ を形成  
させるために利用する環状ポリオール類等の化合物に1個所以上の置換もしくは  
非置換のアルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキ  
シカルボニルオキシを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロ  
ゲン部分にポリアルキレングリコール類Aまたはそのハロゲン化物もしくはトシ  
ル化物を2個所置換させる方法で得ることもできる。

化合物(Ian)およびその合成中間体は、前記と同様の方法で任意の純度のものと  
して単離、精製することができる。

ここで、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換も  
しくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシはそれぞれ前記と同義である。

## 製造法 2 : $X^1$ が S である化合物

化合物(I)のうち、 $X^1$  が S である化合物(Ib)は、例えば製造法 1 と同様に、環状ポリオール類を環状ポリハライド類に変換した化合物 [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19巻 (1992年)、丸善] または市販の環状ポリハライド類と、ポリアルキレングリコール類Aのチオール誘導体とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得ることができる。

また、化合物(Ib)は、前記の工程とは逆に、ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン化物もしくはトシル化物を環状ポリチオール類と反応させることによって得ることができる。

ポリアルキレングリコール類Aのチオール誘導体は市販のものを用いるか、Samuel Zalipskyらによってまとめられた方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] で調製できる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法 1 に準じる。

## 製造法 2 - 1

化合物(Ib)のうち、 $R^2$  がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、 $X^1$  が -S- である化合物を製造法 2 に従って製造した後、製造法 1 - 1 ~ 製造法 1 - 9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

## 製造法 3 : $X^1$ が $NR^3$ である化合物

化合物(I)のうち、 $X^1$  が  $NR^3$  (式中、 $R^3$  は前記と同義である) である化合物(Ic)は、例えば製造法 1 と同様に、環状ポリオール類を環状ポリアミン類に変換した化合物または市販の環状ポリアミン類と、ポリアルキレングリコール類Aのハロゲン

化物もしくはトシル化物とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得ることができる。

化合物(Ic)は、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体を環状ポリハライド類と反応させることによっても得ることができる。

また、化合物(Ic)は環状ポリアルデヒド類1当量と、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体1～10当量とをメタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、水、緩衝液等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、-20～100℃で1～100当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムや水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤の存在下で反応させることによっても得ることができる。

さらに、化合物(Ic)は、環状ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Aのアルデヒド誘導体を用いても製造することができる。

前記環状ポリアルデヒド類としては市販の化合物をそのまま用いるか、環状ポリアルコール類を酸化して用いるか、あるいは環状ポリカルボン酸類を還元して用いればよい。また、ポリアルキレングリコール類Aのアルデヒド誘導体としては市販の化合物を利用できるし、また、ポリアルキレングリコール類Aの末端のアルコールを酸化して用いることもできる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法1に準じる。

### 製造法3-1

化合物(Ic)のうち、R<sup>2</sup>がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物(Ic)を製造法3に従って合成した後、製造法1-1～製造法1-9に記載された方法を組み合わせて製造することができる。

製造法 4 :  $X^1$ が $R^4$ -NH-C(=O)- $R^5$ または $R^6$ -C(=O)-NH- $R^7$ である化合物

化合物(I)のうち、 $X^1$ が $R^4$ -NH-C(=O)- $R^5$  (式中、 $R^4$ および $R^5$ はそれぞれ前記と同義である) である化合物(Ida)は、例えばシクロヘキサントリカルボン酸やKemp's triacid等から選ばれる環状ポリカルボン酸化合物をペプチド合成法[泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験(1985年)、丸善]に従い、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中に溶解または懸濁し、次いで1~30当量のN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール等のアルコール体と、1~30当量のN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロりん酸塩等の縮合剤を加え、さらに1~3当量のポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体を加えて反応させることによって得ることができる。反応は無水条件下、 $-20^{\circ}\text{C}$ ~ $100^{\circ}\text{C}$ で、1時間~10日間攪拌することによって行われる。

また、環状ポリカルボン酸分子中の1個以上のカルボキシをメチル、エチル、ベンジル、tert-ブチル等の適当な保護基で保護した後、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体を残りの2個のカルボキシに前記の方法で導入し、続いてカルボキシの保護基を通常の脱保護法で除去することによって、 $R^2$ がカルボキシである2本鎖分岐型ポリエチレングリコール誘導体を高純度を含む反応液を得ることもできる。この場合、カルボン酸の保護基の導入や該保護基の除去には通常のペプチドの合成法で用いられる方法[泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験(1985年)、丸善]を利用できる。環状ポリカルボン酸類中のカルボキシの配置は、立体配置を含めて何れでもよく、ポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体としては分子量分布が均一(好ましくは、 $M_w/M_n$ が1.1以下)であればいかなる平均分子量のものを用いてもよい。

また、化合物(I)のうち、 $X^1$ が $R^6$ -C(=O)-NH- $R^7$  (式中、 $R^6$ および $R^7$ はそれぞれ前記と同義である) である化合物(Idb)は、前記工程とは逆に、環状ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体の活性エステル、あるいはポ

リアルキレングリコール類Aの酸ハライド誘導体とを反応させる方法でも得ることができる。ポリアルキレングリコール類Aの酸ハライド誘導体はポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0～150℃で、1～24時間加熱することによって得ることができる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

#### 製造法 4 - 1

化合物(Ida)および化合物(Idb)のうち、 $R^2$ がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物(Ida)または化合物(Idb)を製造法 4 に従って合成した後、製造法 1 - 1 ～ 製造法 1 - 9 に記載された方法を組み合わせ得ることができる。

製造法 5 :  $X^1$ が $R^8-C(=O)-O$ または $O-C(=O)-R^9$ である化合物

化合物(I)のうち、 $X^1$ が $R^8-C(=O)-O$  (式中、 $R^8$ は前記と同義である) または  $O-C(=O)-R^9$  (式中、 $R^9$ は前記と同義である) である化合物(Ie)は、例えばポリアルキレングリコール類Aと環状ポリカルボン酸類、あるいはポリアルキレングリコール類Aのカルボン酸誘導体と環状ポリオール類の組合わせを用いて、脱水縮合により得ることができる。脱水縮合の方法としては通常のエステル合成で用いられるような、酸または塩基触媒下に脱水する方法か、あるいはジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ピリジン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、 $N,N'$ -ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤で対応するアルコ

ール体とカルボン酸を縮合する方法等を利用することができる。さらに、上記工程において酸ハロゲン化物と、対応するアルコール体を反応させることによって目的物を合成できる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

#### 製造法 5 - 1

化合物(Ie)のうち、 $R^2$ がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物(Ie)を製造法 5 に従って合成した後、製造法 1 - 1 ~ 製造法 1 - 9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法 6 :  $X^1$ が $R^{6a}$ -O-C(=O)-NHまたは $R^4$ -NH-C(=O)-Oである化合物

化合物(I)のうち、 $X^1$ が $R^{6a}$ -O-C(=O)-NH (式中、 $R^{6a}$ は前記と同義である)である化合物(Ifa)は、例えば以下のようにして製造することができる。

市販の環状ポリアミン類、または前記製造法を組み合わせる環状ポリオール類より調製した環状ポリアミン類にポリアルキレングリコール類Aのカーボネート誘導体を1~3モル過剰に反応させて、化合物(Ifa)を含む粗生成物が得られる。なお、ポリアルキレングリコール類Aのカーボネート誘導体は、Talia Mironらの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、4巻、568頁 (1993年)] に従って製造することができる。また、ポリアルキレングリコール類Aのカーボネート誘導体としては、N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルカーボネート、イミダゾリルカルボニルオキシ誘導体等を利用することができる。

化合物(I)のうち、 $X^1$ が $R^4$ -NH-C(=O)-O (式中、 $R^4$ は前記と同義である)である

化合物(Ifb)は、例えば以下のようにして製造することができる。

化合物(Ifb)は環状ポリオール類のカーボネート誘導体とポリアルキレングリコール類Aのアミノ誘導体とを上記と同様に反応させることによって得ることができる。

他の製造法に準じて官能基の保護、脱保護を組み合わせることによって、化合物(Ifa)または化合物(Ifb)を選択的に生成させることもできる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

#### 製造法 6 - 1

化合物(If)のうち、 $R^2$ がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物(If)を製造法 6 に従って合成した後、製造法 1 - 1 ~ 製造法 1 - 9 に記載された方法を組み合わせて調製することができる。

$R^1-M_n-X^1$ をLに結合して1本鎖化合物を取得し、同様の反応で前記と同一または異なる $R^1-M_n-X^1$ をLに結合して、2本鎖の化合物を取得することもできる。例えば、製造法 1 ~ 6 に示した方法のうちいずれかの反応を利用してL中の1個所の官能基にポリアルキレングリコール類を結合させ、1本鎖化合物を得る。生成する1本鎖化合物の割合は、反応に使用するポリアルキレングリコール類と、L部分の構造を構築する原料の比を変えることで調節することができ、1本鎖化合物を主成分にすることも可能である。得られた1本鎖化合物はそのままの純度で、あるいは製造法 1 に示した方法に準じて任意の純度に、あるいは高純度に精製して次のステップに使用することができる。

このようにして得られた1本鎖化合物と、前記と同一または異なるポリアルキレングリコール類を製造法 1 ~ 6 に示したいずれかの方法に準じて結合して、2本鎖

化合物が調製できる。なお、2本目のポリアルキレングリコール類は1本鎖化合物を取得した反応と同様の反応に付すこともできるが、異なる反応に付し異なる結合様式を有するように調製してもよい。例えば、水酸基、アミノ、カルボキシ等の複数の官能基を有する化合物をL部分の構造を構築する原料に使用する場合、製造法1に示した方法で $X^1$ がOである1本鎖化合物をまず取得し、次いで製造法4に示した方法で2本目のポリアルキレングリコール類を $X^1$ が $R^4-NH-C(=O)-R^5$ となるように反応させることができる。以上のように製造法1～6の組合わせで2つのポリアルキレングリコール類が同一または異なる結合様式でLに結合した2本鎖化合物を得ることができる。さらに、使用するポリアルキレングリコール類は1本目と2本目の分子量が異なってもよく、各々のポリアルキレングリコール類をLに結合させる反応で異なる平均分子量のポリアルキレングリコール類を使用することで容易に目的物が得られる。

また、Lにポリアルキレングリコール類を導入する反応において、L中の1個所以上の官能基（例えば製造法1の場合、1個所以上の水酸基）を残し、他の官能基を適当な保護基で保護してから、ポリアルキレングリコール類と反応、結合させ、その後、保護基を除去することも可能である。

本発明の分岐型ポリアルキレングリコール類は、上記製造法で具体的に示された化合物以外であっても、上記製造法に準じて得ることができる。

なお、先にも述べたとおり、製造法1～6の各工程において、原料に用いるポリアルキレングリコール類は市販のものを用いることもできるが、Samuel Zalipsky [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)] によってまとめられた各種の方法等によって容易に製造することも可能である。

式(Ix)の各基の定義において、低級アルキルおよび低級アルカノイルの低級アルキル部分は、直鎖状または分岐状の炭素数1～8の、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル等を包含する。アルキレンは、炭素数1～8の、例えばメチレン、エチレン、n-プロピレン、イソプロピレン、n-



ブチレン、イソブチレン、sec-ブチレン、tert-ブチレン、ペンチレン、ネオペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン等を包含する。

式(Ix)において、 $M_x$ は $OCH_2CH_2$ 、 $OCH_2CH_2CH_2$ 、 $OCH(CH_3)CH_2$ 、 $(OCH_2CH_2)_{rx}-(OCH_2CH_2CH_2)_{sx}$ （式中、 $rx$ および $sx$ は同一または異なって、任意の正の整数を表す）または $(OCH_2CH_2)_{rax}-[OCH(CH_3)CH_2]_{sax}$ （式中、 $rax$ および $sax$ はそれぞれ前記 $rx$ および $sx$ と同義である）を表し、 $(OCH_2CH_2)_{rx}-(OCH_2CH_2CH_2)_{sx}$ （式中、 $rx$ および $sx$ はそれぞれ前記と同義である）または $(OCH_2CH_2)_{rax}-[OCH(CH_3)CH_2]_{sax}$ （式中、 $rax$ および $sax$ はそれぞれ前記と同義である）である場合、 $rx$ および $sx$ ならびに $rax$ および $sax$ は、好ましくは1~100,000であり、さらに好ましくは1~1,000である。

式(Ix)において、 $n_x$ は任意の正の整数を表し、好ましくは10~100,000であり、さらに好ましくは100~1,000である。

式(Ix)において開示される、1本鎖ポリアルキレングリコール類が3本以上結合し、かつ、生理活性ポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基が結合した分岐型ポリアルキレングリコール類、 $(M_x)_{n_x}$ で表されるポリアルキレングリコール部分の平均分子量は、約1,000~1,000,000が好ましく、5,000~100,000がさらに好ましい。 $(M_x)_{n_x}$ が $-(OCH_2CH_2)_{n_x}-$ である場合、原料となるポリエチレングリコール類は $M_w$ （重量平均分子量）/ $M_n$ （数平均分子量）で表される分子量分布が1.1以下の単分散のものが望ましく、平均分子量30,000以下であれば市販のものを利用することができる。例えば、平均分子量が2,000、5,000、10,000、12,000、20,000等のモノメトキシポリエチレングリコールが利用できる。

式(Ix)において、 $q_x$ は1~3の整数を表し、好ましくは1である。

式(Ix)において、 $m_x$ は3以上の整数を表し、好ましくは3~4である。

式(Ix)で表される分岐型ポリアルキレングリコール類の分子量は、500~1,000,000の範囲にあることが好ましい。

式(Ix)において、 $L_x$ は4以上分岐が可能な基であり、 $L_x$ 上の置換基として、水酸基、置換もしくは非置換の低級アルキル、低級アルコキシ、アミノ、カルボキシ、

シアノまたはホルミル等を有していてもよい。ここで、低級アルキルおよび低級アルコキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義であり、置換低級アルキルにおける置換基としては、水酸基、アミノ、低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイル、低級アルキルカルバモイルオキシ等があげられる。低級アルカノイルオキシ、低級アルカノイルアミノ、低級アルコキシ、低級アルコキシアルコキシ、低級アルカノイル、低級アルコキシカルボニル、低級アルキルカルバモイルおよび低級アルキルカルバモイルオキシの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。

Lxで表わされる4以上分岐が可能な基としては、 $X^{2x}-X^{3x}$ を介してポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基に変換可能な基、あるいは該反応性を有する基を結合でき、 $X^{1x}$ を介して1本鎖ポリアルキレングリコール類を3分子以上分岐させることができればいかなる基を用いてもよい。Lxとしては、例えばポリオール類、ポリカルボン酸等で、分子量1,000以下の化合物から水素原子4個以上を除いた基があげられる。ポリオール類の具体例としては、グルコース、D, L-ソルビトール、リボース、エリスリトール、ペンタエリスリトール、トリシン (Tricine、N-[Tris (hydroxymethyl) methyl]glycine)、イノシトール、コール酸、3,4,5-トリヒドロキシベンゾイックアシッド (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid, Gallic acid)、2,4,6-トリヒドロキシベンゾイックアシッド、3,4,5-トリヒドロキシベンズアルデヒド、キナ酸 (Quinic acid)、シキミ酸 (Shikimic acid)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン等の低分子化合物およびそれらの立体異性体等があげられ、ポリカルボン酸の具体例としては、1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸、ピロメリト酸、ジエチレントリアミンペンタアセティックアシッド、1,2,3,4-ブタンテトラカルボン酸、クエン酸、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸等の低分子化合物およびそれらの立体異性体等があげられる。

Lxとして好ましい基としては、トリシンから水素原子4個以上を除いた基、シキミ酸から水素原子4個以上を除いた基、キナ酸から水素原子4個以上を除いた

基、エリスリトールから水素原子4個以上を除いた基、ペンタエリスリトールから水素原子4個以上を除いた基およびグルコースから水素原子4個以上を除いた基等があげられる。

Lx部分の構造の構築は、例えば市販品の化合物をそのまま利用するか、一般の有機合成法によってポリアルキレングリコール類の結合に適した形に誘導体化して利用するか、あるいは官能基の保護を行った後に利用して行うことができる[日本化学会編、実験化学講座 第4版(1992年)、有機合成I~V、丸善、プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス(PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド(JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年)等]。

上記で例示した以外のシクロヘキサン類は、例えば木曾ら[大有機化学、第6巻、183頁(1958年)、朝倉書店]またはG. E. McCaslandとE. Clide Horswill[ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイティ(Journal of American Chemical Society)、76巻、2373頁(1954年)]の方法等に従って合成することができる。

式(Ix)において、 $X^{1x}$ を介したポリアルキレングリコール類とLxとの結合は通常の有機合成法で知られている反応を容易に組み合わせて行うことができる[日本化学会編、実験化学講座 第4版、19-23頁(1992年)、有機合成I~V、丸善]。

式(Ix)において、 $R^{2x}$ はポリペプチド中のアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基と反応性を有する基か、該反応性を有する基に変換可能な基を表す。

すなわち、上記反応性を有する基としては、ポリペプチド中の、リジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン等の各側鎖、N末端アミノ基、C末端カルボキシル基のいずれかと反応性を有する基が包含され、例えば水酸基、カルボキシ、ホルミル、アミノ、ビニルスルホニル、メルカプト、シアノ、カルバモイル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、オキシラニル、低級アルカノイルオキシ、マレイミド、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾ

トリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、イミダゾリルカルボニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシ、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシ、トレシル、低級アルカノイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアロイルオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールジスルフィド、アジド等があげられる。

上記の各基の定義において、低級アルコキシカルボニルオキシ、ハロゲン化低級アルキル、低級アルカノイルオキシおよび低級アルカノイルオキシカルボニルの低級アルキル部分は、前記低級アルキルと同義である。アリールオキシカルボニル、アリールオキシカルボニルオキシおよびアリールジスルフィドのアリール部分としては、炭素数6~14の、例えばフェニル、ナフチル、ビフェニル、アントリル等があげられる。アロイルオキシカルボニルのアロイル部分としては、炭素数7~13の、例えばベンゾイル、ナフトイル、フタロイル等があげられる。ハロゲン化カルボニルおよびハロゲン化低級アルキルのハロゲン部分としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子があげられる。

置換低級アルコキシカルボニルオキシにおける置換基としては、同一または異なって置換数1~3の、例えば、水酸基、カルボキシ、ハロゲン等があげられる。ここで、ハロゲンは、前記と同義である。

置換アリールオキシカルボニル、置換アリールオキシカルボニルオキシ、置換アリールジスルフィドおよび置換アロイルオキシカルボニルにおける置換基としては、同一または異なって置換数1~3の、例えば水酸基、カルボキシ、ハロゲン、シアノ、低級アルキル等があげられる。ここで、ハロゲンおよび低級アルキルは、それぞれ前記と同義である。

$R^{2x}$ で表される基は、 $Lx$ 部分の構造を構築する原料に含まれていてもよいし、該原料化合物中の必要な官能基をあらかじめ適当な保護基 [プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等] で保護し、 $X^{1x}$ を介してポリアルキレングリコール類を $Lx$ に結合して分岐させた後に脱保護、さらには必要に

より変換して形成してもよい。さらにポリアルキレングリコール類を $X^{1x}$ を介して $Lx$ から分岐させた後に、通常の有機合成法によって $Lx$ に必要により $X^{2x}$ または $X^{3x}$ を介して前記 $R^{2x}$ を導入することもできる。

より具体的には、例えば以下の製造法で本発明における分岐型ポリアルキレングリコール類を製造することができるが、製造法は、これらに限定されるものではない。

製造法 1 x :  $X^{1x}$ が結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{tax}$ 、または $(CH_2)_{tbx}O$ である化合物の製造

化合物(Ix)のうち、 $X^{1x}$ が結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{tax}$  (式中、 $tax$ は前記と同義である)、または $(CH_2)_{tbx}O$  (式中、 $tbx$ は前記と同義である)である化合物 (Iax) は、例えば以下の方法により製造することができる。

水酸基を3個所以上有するポリオール類を、無水状態でN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、ポリアルキレングリコールまたはそのモノアルキルエーテルもしくはモノカルボン酸エステル (以下、これらをまとめてポリアルキレングリコール類 $Ax$ という) のハロゲン化物もしくはトシル化物を3モル以上加えて、 $-20\sim 150^\circ\text{C}$ で1時間~10日間反応させて、3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物が得られる。

ポリオール類はキナ酸、グルコース、ソルビトール、リボース、エリスリトール、ペンタエリスリトール、トリシン、イノシトール等の市販の化合物、または市販の化合物から導かれる化合物等から選ばれる。市販の化合物から導かれる化合物としては、例えばエチレンジアミンテトラ酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸 (1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid)、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 ( $\gamma$ -carboxyglutamic acid) 等から選ばれるポリカルボン酸を通常の有機合成法 [日本化学会編、実験化学講座 第4版、19~21巻 (1992

年)、丸善]に従って適当な還元剤で還元することによって得られるポリオール類等があげられる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

ポリオール類中の水酸基の配置は何れでもよく、反応に不必要な官能基を文献[プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年) 等]に記載の方法によって適当に保護、あるいは誘導体化してから、反応に使用することができる。

ポリアルキレングリコール類Axのハロゲン化物およびトシル化物はSamuel Zalipskyの総括[バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁(1995年)]等の開示された各種の方法で容易に製造することができる。結合に使用するポリアルキレングリコール類Axのハロゲン化物およびトシル化物としては分子量分布が均一であれば(好ましくは、 $M_w/M_n$ が1.1以下)いかなる平均分子量のものも用いられる。

得られた3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物はそのままの純度、あるいはイオン交換クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法で3本鎖、4本鎖、5本鎖、またはそれ以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を分岐数に応じて任意の純度に精製、単離して、次のステップに用いることができる。ここまでの工程で、化合物(Iax)のうち、 $R^2$ が水酸基である化合物(Iajx)のいくつかが得られる。

一方、ポリハライド類またはポリトシル類とポリアルキレングリコール類Axを使用することによっても目的の3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を調製することができる。この場合、3モル相当以上のポリアルキレングリコール類AxをN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1モルのポリアルキレングリコール類Axあたり1~30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、ト

リエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1モル相当のポリハライド類またはポリトシル類を加えて、 $-20\sim 150^{\circ}\text{C}$ で1時間～10日間反応させて目的物が得られる。

ポリハライド類は市販の化合物であるか、前記ポリオール類をハロゲン化合物に変換〔日本化学会編、実験化学講座、第4版、19巻（1992年）、丸善〕して得られる。ポリトシル類はポリオール類をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、水酸基当たり1～30モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、リエチルアミン、カリウムナフタレン等の適当な塩基の存在下、水酸基当たり1～3モル相当のハロゲン化トシルを加えて、 $-20\sim 150^{\circ}\text{C}$ で1時間～数日間反応させることで得ることができる。

次に、得られた3本鎖以上の分岐型ポリアルキレングリコール類を含む混合物または精製化合物に、 $\text{R}^{2x}$ を導入する。 $\text{R}^{2x}$ としては、ポリアルキレングリコール類 $\text{Ax}$ またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物をポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類に結合した後、ポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類に残存している官能基をそのまま利用するか、あるいはあらかじめポリオール類に結合している官能基を保護しておき、ポリアルキレングリコール類 $\text{Ax}$ またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合後、官能基の保護基を除去して得られる基を利用してもよい。この場合、前記ポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類中の1個所以上の水酸基、または他の官能基を適当な保護基で保護した後、前記と同様の方法で残りの水酸基、ハロゲンまたはトシル基部分にポリアルキレングリコール類 $\text{Ax}$ またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を導入し、3本以上のポリアルキレングリコールが結合した化合物を合成し、保護基を除去した官能基をそのまま利用するか、あるいは該官能基の少なくとも一つを後述する方法に従って $\text{R}^{2x}$ に変換する。ポリアルキレングリコール類 $\text{Ax}$ またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を結合する前、もしくは結合した後にポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類に存在する官能基としては、水酸基の他に、カルボキシ、アミノ、ハロゲン、シアノ、ホルミル、カルボニル等がある。適当な官能基の保護基としては水酸基の場合、ベンジル、tert-ブチル、アセチル、

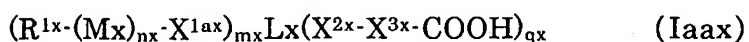
ベンジルオキシカルボニル、tert-ブチルオキシカルボニル、ジメチルtert-ブチルシリル、ジフェニルtert-ブチルシリル、トリメチルシリル、トリフェニルシリル、トシル、テトラヒドロピラニル等があげられ、アミノの場合、メチル、エチル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、ニトロベンジルオキシカルボニル、N-フタルイミド、アセチル、tert-ブチルオキシカルボニル等があげられ、カルボキシの場合、ベンジル、メチル、エチル、tert-ブチル、9-フルオレニルメチル、メトキシエトキシメチル、2,2,2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、シンナモイル、アリル、ニトロフェニル等があげられ、ホルミルの場合、ジメチルアセタール、ジエチルアセタール、ジベンジルアセタール、1,3-ジオキサニル等があげられる [プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS)、第2版、ジョン ワイリー アンド サンズ インコーポレイテッド (JOHN WILEY & SONS, INC.) (1991年)]。

あらかじめ存在する官能基をそのまま、または保護、脱保護して $R^{2x}$ として利用でき、Lx部分の構造を構築する原料となるポリオール類、ポリハライド類またはポリトシル類の具体例としては、シキミ酸、キナ酸、3,4,5-トリヒドロキシベンゾイックアシッド、コール酸またはこれらのハライド、トシル化物等があげられる。

化合物(Ix)のうち、Lxを含む化合物に新たに置換基 $R^{2x}$ を導入して得られる化合物の場合、例えば以下の製造方法で容易に製造を行うことができる。

#### 製造法 1 x - 1

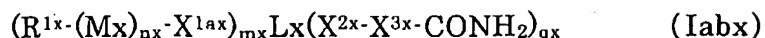
化合物(Iax)のうち、 $R^{2x}$ がカルボキシである式 (Iaax)



(式中、 $X^{1ax}$ は結合、O、アルキレン、 $O(CH_2)_{1ax}$ 、または $(CH_2)_{1bx}O$ を表し、 $R^{1x}$ 、Lx、Mx、nx、mx、qx、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物、

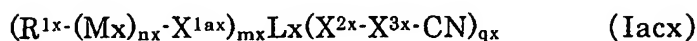


$R^{2x}$ がカルバモイルである式 (Iabx)



(式中、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$  および  $X^{3x}$  はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物、

$R^{2x}$ がシアノである式 (Iacx)



(式中、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$  および  $X^{3x}$  はそれぞれ前記と同義である) で表される化合物は例えば以下のように合成することができる。

化合物 (Iaax)、化合物 (Iabx) および化合物 (Iacx) は、ポリオール類を用いて、例えば製造法 1 x に従って得られる化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ として水酸基を有する化合物 (Iajx) を含む反応混合物または精製化合物を水、塩化メチレン、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒中、触媒量または1~20%の塩基存在下、1~30モル相当のアクリル酸、アクリルアミド、アクリロニトリル等と、-20~150°Cで1時間~数日間反応させて得ることができる。塩基としては、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水素化ナトリウム等があげられる。また、化合物 (Iaax) は、例えば製造法 1 x で得られる化合物 (Iajx) を含む反応混合物または精製化合物を無水状態でN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モル相当の $\alpha$ -ハロゲン化酢酸エステルと、-20~150°Cで1時間~数日間反応させた後、加水分解して得ることもできる。さらに、化合物 (Iaax) は、例えば製造法 1 x で得られる化合物 (Iajx) をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1~50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1~50モルのスクシンイミジルカーボネート、p-

ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、  
-20～100℃で1時間～10日間反応させて活性化し、その後、 $\gamma$ -アミノ酪酸、グリ  
シン、 $\beta$ -アラニン等のアミノ酸またはその誘導体と反応させることによって得  
られる。

また、製造法 1 x で得られる化合物 (Ia<sub>jx</sub>) を前記同様の塩基存在下、無水コハ  
ク酸、無水グルタル酸等の酸無水物と反応させることによって化合物 (Ia<sub>ax</sub>)  
を製造することができる。

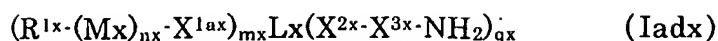
また、化合物 (Ia<sub>ax</sub>) は、例えばポリハライド類を用いて製造法 1 x に従って、  
化合物 (Ia<sub>x</sub>) のうち R<sup>2x</sup> がハロゲン化低級アルキルである化合物 (Ia<sub>ix</sub>) を製造し  
た後、ヒドロキシカルボン酸エステル、マロン酸エステル、 $\gamma$ -アミノ酪酸のエス  
テル体、 $\beta$ -アラニンのエステル体、グリシンのエステル体等を N,N-ジメチルホル  
ムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶  
媒に溶解または懸濁し、1～50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリ  
ウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、化合物 (Ia<sub>ix</sub>) を加え、-20～  
150℃で1時間～数日間反応を行った後、加水分解して得ることもできる。

さらに、化合物 (Ia<sub>ax</sub>) は、例えば前記ポリオール類もしくはポリハライド類  
の一個所以上の水酸基またはハロゲンを、あらかじめカルボン酸あるいはカルボ  
ン酸の保護体を含む残基で置換し、これを用いて製造法 1 で示した方法でポリオ  
ール類もしくはポリハライド類の残りの3個所以上の水酸基またはハロゲンをポ  
リアルキレングリコール類 A<sub>x</sub> またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物で置  
換することで得ることもできる。この場合、カルボン酸またはカルボン酸の保護  
体を含む残基の導入は、前記と同様にして行うことができる。カルボン酸を保護  
した場合には、ポリアルキレングリコール類 A<sub>x</sub> またはそのハロゲン化物もしくは  
トシル化物をポリオール類もしくはポリハライド類に導入した後に脱保護して遊  
離カルボン酸を生成させる。

カルボン酸に変換された化合物は、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水ク  
ロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、二相分配、再結晶等の既知の方法  
で、任意の純度で精製、単離することができる。

## 製造法 1 x - 2

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がアミノである式 (Iadx)



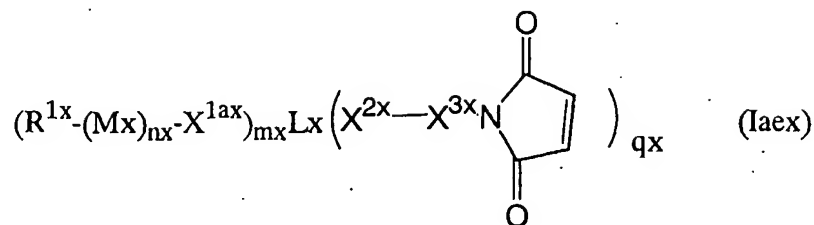
(式中、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば製造法 1 x - 1 で得られる化合物 (Iacx) に適当な還元剤を作用させて得られる。還元剤としては、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素等があげられる。

また、化合物 (Iadx) は、例えば製造法 1 x で得られる化合物 (Iaix) または化合物 (Iaix) 中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物に5当量～過剰量のエチレンジアミン、プロピレンジアミン等のジアミン類を適当な塩基存在下で反応させることによって得られる。

さらに、製造法 1 x - 1 で示したのと同様に、化合物 (Iadx) は、例えば化合物 (Iajx) をN,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、トルエン、テトラヒドロフラン等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、1～50モルの水素化ナトリウム、酸化亜鉛、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン等の適当な塩基の存在下、1～50モルのスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルクロロホルメート、カルボニルジイミダゾール等の活性化剤と、-20～100℃で1時間～10日間反応させて活性化し、その後、1当量～過剰量のエチレンジアミンやプロピレンジアミン等のジアミン類と適当な塩基存在下で反応させることによって得られる。

また、化合物 (Iadx) は、例えば製造法 1 x で示した方法に準じ、あらかじめ  $Lx$  を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に1個所以上のアミノまたはアミノの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類  $Ax$  またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を3個所以上置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がマレイミドである式 (Iaex)



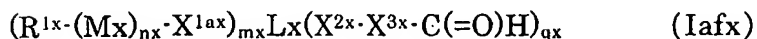
(式中、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えばOskar Kellerらの方法[ヘルベチカ キミカ アクタ (Helv. Chim. Acta)、58巻、531頁(1975年)]またはTimothy P. Koganらの方法[シンセティック コミュニケーション (Synthetic Commun.)、22巻、2417頁(1992年)]に従い、化合物 (Iadx) とN-アルコキシカルボニルマレイミドとを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で反応させることで得ることができる。N-アルコキシカルボニルマレイミドとしてはN-エトキシカルボニルマレイミドやN-メトキシカルボニルマレイミドを用いることができる。

また、化合物 (Iaex) は、例えば製造法 1 x で示した方法に準じ、あらかじめ  $Lx$ を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に1個所以上のマレイミドを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類  $Ax$  またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を3個所以上置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Iadx)、化合物 (Iaex) およびそれらの合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

### 製造法 1 x - 3

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がホルミルである式 (Iafx)



(式中、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば製造法 1 x で得られる化合物 ( $Iax$ ) のうち  $R^{2x}$  としてヒドロキシメチルを有する化合物 ( $Iagx$ ) を適当な酸化剤で酸化することによって得られる。酸化剤としては塩化クロム酸ピリジニウム、クロム酸、銀イオン、ジメチルスルホキシド等があげられる。また、化合物 ( $Iaax$ ) を前記と同様に適当な還元剤で還元することによっても得ることができる。

また、例えば製造法 1 x で得られる化合物 ( $Iajx$ )、化合物 ( $Iaix$ ) または化合物 ( $Iaix$ ) 中のハロゲン部分がトシル基で置換された化合物にアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール、ハロゲン化エチルアセタール、ハロゲン化メチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

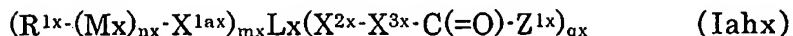
同様にして、製造法 1 x で得られる化合物 ( $Iajx$ ) を用い、製造法 1 x - 1 で示した方法に準じて水酸基を活性化し、続いてアミノエチルアセタール、ヒドロキシエチルアセタール等を結合させ、次いでアセタールを除去することによってもホルミルを導入することができる。

また、化合物 ( $Iafx$ ) は、例えば製造法 1 x で示した方法に準じ、あらかじめ  $Lx$  を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に 1 個所以上のアルデヒド、あるいはアルデヒドの保護体を導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類  $Ax$  またはそのハロゲン化合物もしくはトシル化物を 3 個所以上置換させる方法でも得られる。

化合物 ( $Iafx$ ) およびその合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

#### 製造法 1 x - 4

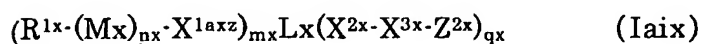
化合物 ( $Iax$ ) のうち、 $R^{2x}$  がハロゲン化カルボニルである式 ( $Iahx$ )



(式中、 $Z^{1x}$ はハロゲンを表し、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば $R^{2x}$ がカルボキシである化合物 (Iaax) をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0~150°Cで1~24時間加熱することによって得られる。ハロゲン化カルボニルにおけるハロゲンは前記ハロゲンと同義である。

#### 製造法 1 x - 5

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がハロゲン化低級アルキルである式 (Iaix)



(式中、 $Z^{2x}$ はハロゲン化低級アルキルを表し、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば $R^{2x}$ が水酸基である化合物 (Iajx) をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0~150°Cで1~24時間加熱することによって得られる。ハロゲン化低級アルキルにおけるハロゲンおよび低級アルキル部分はそれぞれ前記と同義である。

また、化合物 (Iaix) は、例えば製造法 1 x で得られる化合物 (Iajx) または $R^{2x}$ がアミノである化合物 (Iadx) に、前記同様適当な塩基存在下、5当量~過剰量のジブロモエタンやジブロモプロパン等のジハロゲン化アルキル類を反応させることによって得られる。

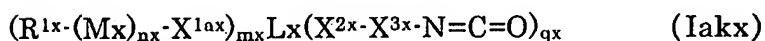
さらに、化合物 (Iaix) は、例えば前記製造法 1 x で示した方法に準じ、あらかじめ $Lx$ を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に1個所以上のハロゲン化低級アルキルを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類 $Ax$ またはそのハロゲン化物もしくはト

シル化合物を3個所以上置換させる方法によっても得られる。

化合物 (Iaix) およびその合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

#### 製造法 1 x - 6

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がイソシアナートである式 (Iakx)

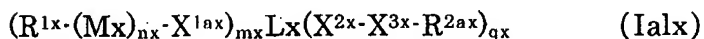


(式中、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば、化合物 (Iadx) をトルエン、テトラヒドロフラン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、ホスゲンまたは塩化オキサリルと0～150℃で1～24時間反応させるか、N,N'-カルボニルジイミダゾールと反応させた後に室温で分解させて得られる。

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がイソチオシアナート ( $-N=C=S$ ) である化合物 (Iapx) はホスゲンの代わりにチオホスゲンを用いる以外は上記の方法に従って製造することができる。

#### 製造法 1 x - 7

化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ がスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルである式 (Ialx)



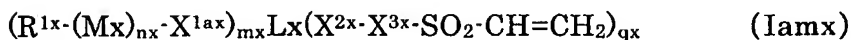
(式中、 $R^{2ax}$ はスクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニルまたはフタルイミドオキシカルボニルを表し、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれ

それ前記と同義である)で表される化合物は、通常のエステル合成方法に従って製造することができる。例えば、化合物 (Iaax) 1モルに対し、N-ヒドロキシスクシンイミド、置換もしくは非置換の水酸化アリール、N-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたはN-ヒドロキシフタルイミド1~10モルを、1~10モルのN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤存在下、ジメチルホルムアミド、塩化メチレン、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中、-20~100°Cで1~24時間反応させることによって目的物を得ることができる。より詳しくは、A. Fradetら [ポリマーブルチン (Polym. Bull.)、4巻、205頁 (1981年)]、またはK. Geckelerら [ポリマーブルチン (Polym. Bull.)、1巻、691頁 (1979年)] によるポリアルキレングリコールの末端にカルボキシル基を導入する方法、カルボキシメチルポリアルキレングリコールのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの製造方法等に準じて得ることができる。

ここで、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルは前記と同義である。水酸化アリールのアリール部分はアリールオキシカルボニルのアリール部分と同義であり、置換水酸化アリールの置換基は、置換アリールオキシカルボニルの置換基と同義である。

#### 製造法 1 x - 8

化合物 (Iax) のうち、R<sup>2x</sup>がビニルスルホニルである式 (Iamx)



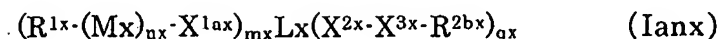
(式中、R<sup>1x</sup>、Lx、Mx、nx、mx、qx、X<sup>1ax</sup>、X<sup>2x</sup>およびX<sup>3x</sup>はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えば化合物 (Iajx) を用いて Margherita Morpurgo らの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、7巻、363頁 (1996年)] で製造することができる。

#### 製造法 1 x - 9



化合物 (Iax) のうち、 $R^{2x}$ が置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである式

(I anx)



(式中、 $R^{2bx}$ は置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを表し、 $R^{1x}$ 、 $Lx$ 、 $Mx$ 、 $nx$ 、 $mx$ 、 $qx$ 、 $X^{1ax}$ 、 $X^{2x}$ および $X^{3x}$ はそれぞれ前記と同義である)で表される化合物は、例えばTalia MironとMeir Wilchekの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、4巻、568頁 (1993年)] に準じて、 $R^{2x}$ が水酸基である化合物 (Iajx) と過剰量のp-ニトロフェニルクロロホルメート、エチルクロロホルメート等とをジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン等の塩基存在下で反応させることで得られる。

また、化合物 (I anx) は、例えば製造法 1 x で示した方法に準じ、あらかじめ  $Lx$  を形成させるために利用するポリオール類等の化合物に1個所以上の置換もしくは非置換のアルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシを導入し、これを用いて該化合物の残りの水酸基またはハロゲン部分にポリアルキレングリコール類  $Ax$  またはそのハロゲン化物もしくはトシル化物を3個所以上置換させる方法で得ることもできる。

化合物 (I anx) およびその合成中間体は、前記と同様の方法でポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度のものとして単離、精製することができる。

ここで、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシはそれぞれ前記と同義である。

製造法 2 x :  $X^{1x}$  が S である化合物

化合物 (Ix) のうち、 $X^{1x}$  が S である化合物 (Ibx) は、例えば製造法 1 x と同様

に、ポリオール類をポリハライド類に変換した化合物〔日本化学会編、実験化学講座 第4版、19巻（1992年）、丸善〕または市販のポリハライド類と、ポリアルキレングリコール類Axのチオール誘導体とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させることによって得ることができる。

また、化合物(Ibx)は、前記の工程とは逆に、ポリアルキレングリコール類Axのハロゲン化物もしくはトシル化物をポリチオール類と反応させることによって得ることができる。

ポリアルキレングリコール類Axのチオール誘導体は市販のものをを用いるか、Samuel Zalipskyらによってまとめられた方法〔バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁（1995年）〕で調製できる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法1xに準じる。

#### 製造法2x-1

化合物(Ibx)のうち、R<sup>2x</sup>がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、X<sup>1x</sup>が-S-である化合物を製造法2xに従って製造した後、製造法1x-1～製造法1x-9に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

#### 製造法3x : X<sup>1x</sup>がNR<sup>3x</sup>である化合物

化合物(Ix)のうち、X<sup>1x</sup>がNR<sup>3x</sup>（式中、R<sup>3x</sup>は前記と同義である）である化合物(Icx)は、例えば製造法1xと同様に、ポリオール類をポリアミン類に変換した化合物または市販のポリアミン類と、ポリアルキレングリコール類Axのハロゲン化物もしくはトシル化物とを、適当な溶媒中、適当な塩基の存在下で反応させる

ことによって得ることができる。

化合物 (Icx) は、ポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体をポリハライド類と反応させることによっても得ることができる。

また、化合物 (Icx) はポリアルデヒド類1当量と、ポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体 (該ポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体は、ポリアルデヒド類の1つのホルミル基あたり1~30当量存在させる) とを、メタノール、エタノール、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、水、緩衝液等の適当な溶媒に溶解または懸濁し、-20~100°Cでシアノ水素化ホウ素ナトリウムや水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤 (該還元剤は、ポリアルデヒド類の1つのホルミル基あたり1~30当量用いる) の存在下で反応させることによっても得ることができる。

さらに、化合物 (Icx) は、ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Axのアルデヒド誘導体を用いても製造することができる。

前記ポリアルデヒド類としては市販の化合物をそのまま用いるか、ポリアルコール類を酸化して用いるか、あるいはポリカルボン酸類を還元して用いればよい。また、ポリアルキレングリコール類Axのアルデヒド誘導体としては市販の化合物を利用できるし、また、ポリアルキレングリコール類Axの末端のアルコールを酸化して用いることもできる。

各工程の反応条件、精製条件は製造法 1 x に準じる。

### 製造法 3 x - 1

化合物 (Icx) のうち、 $R^{2x}$ がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Icx) を製造法 3 x に従って合成した後、製造

法 1 x - 1 ~ 製造法 1 x - 9 に記載された方法を組み合わせて製造することができる。

製造法 4 x :  $X^{1x}$  が  $R^{4x}-NH-C(=O)-R^{5x}$  または  $R^{6x}-C(=O)-NH-R^{7x}$  である化合物

化合物 (Ix) のうち、 $X^{1x}$  が  $R^{4x}-NH-C(=O)-R^{5x}$  (式中、 $R^{4x}$  および  $R^{5x}$  はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (Idax) は、例えば  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸、クエン酸、1, 2, 3, 4-ブタンテトラカルボン酸等から選ばれるポリカルボン酸化合物をペプチド合成法 [泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善] に従い、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等の適当な溶媒中に溶解または懸濁し、次いでポリカルボン酸化合物中の1つのカルボキシル基あたり1~30当量のN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシフタルイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール等のアルコール体と、ポリカルボン酸化合物中の1つのカルボキシル基あたり1~30当量のN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロりん酸塩等の縮合剤を加え、さらにポリカルボン酸化合物中の1つのカルボキシル基あたり1~30当量のポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体を加えて反応させることによって得ることができる。反応は無水条件下、-20°C~100°Cで、1時間~10日間攪拌することによって行われる。

また、ポリカルボン酸分子中の1個以上のカルボキシをメチル、エチル、ベンジル、tert-ブチル等の適当な保護基で保護した後、ポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体を残りのカルボキシに前記の方法で導入し、続いてカルボキシの保護基を通常の方法で除去することによって、 $R^{2x}$  がカルボキシである3本鎖以上の分岐型ポリエチレングリコール誘導体を高純度を含む反応液を得ることもできる。この場合、カルボン酸の保護基の導入や該保護基の除去には通常の方法[泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善] を利用できる。ポリカルボン酸類中のカルボキシの配置は、立体配置を含めて何れでもよく、ポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体としては分子量分布が均一 (好ましくは、 $M_w/M_n$  が1.1以下) であればいかなる平均分子量のも

のを用いてもよい。

また、化合物 (Ix) のうち、 $X^{1x}$ が $R^{6x}-C(=O)-NH-R^{7x}$  (式中、 $R^{6x}$ および $R^{7x}$ はそれぞれ前記と同義である) である化合物 (Idbx) は、前記工程とは逆に、ポリアミン類とポリアルキレングリコール類Axのカルボン酸誘導体の活性エステル、あるいはポリアルキレングリコール類Axの酸ハライド誘導体とを反応させる方法でも得ることができる。ポリアルキレングリコール類Axの酸ハライド誘導体はポリアルキレングリコール類Axのカルボン酸誘導体をハロゲン化チオニルまたはハロゲン化チオニルとトルエン、ジメチルホルムアミド等の適当な混合溶媒中、ピリジン、トリエチルアミン等の適当な触媒存在下で、0~150°Cで、1~24時間加熱することによって得ることができる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

#### 製造法 4 x - 1

化合物 (Idax) および化合物 (Idbx) のうち、 $R^{2x}$ がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Idax) または化合物 (Idbx) を製造法 4 x に従って合成した後、製造法 1 x - 1 ~ 製造法 1 x - 9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法 5 x :  $X^{1x}$ が $R^{8x}-C(=O)-O$ または $O-C(=O)-R^{9x}$ である化合物

化合物 (Ix) のうち、 $X^{1x}$ が $R^{8x}-C(=O)-O$  (式中、 $R^{8x}$ は前記と同義である) または $O-C(=O)-R^{9x}$  (式中、 $R^{9x}$ は前記と同義である) である化合物 (Iex) は、例えばポリアルキレングリコール類Axとポリカルボン酸類、あるいはポリアルキレングリコール類Axのカルボン酸誘導体とポリオール類の組合わせを用いて、脱水縮合

により得ることができる。脱水縮合の方法としては通常のエステル合成で用いられるような、酸または塩基触媒下に脱水する方法か、あるいはジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ピリジン、塩化メチレン等の適当な溶媒中、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤で対応するアルコール体とカルボン酸を縮合する方法等を利用することができる。さらに、上記工程において酸ハロゲン化物と、対応するアルコール体を反応させることによって目的物を合成できる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

#### 製造法 5 x - 1

化合物 (Iex) のうち、 $R^{2x}$  がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Iex) を製造法 5 x に従って合成した後、製造法 1 x - 1 ~ 製造法 1 x - 9 に記載された方法を組み合わせて得ることができる。

製造法 6 x :  $X^{1x}$  が  $R^{6ax}-O-C(=O)-NH$  または  $R^{4x}-NH-C(=O)-O$  である化合物

化合物 (Ix) のうち、 $X^{1x}$  が  $R^{6ax}-O-C(=O)-NH$  (式中、 $R^{6ax}$  は前記と同義である) である化合物 (Ifax) は、例えば以下のようにして製造することができる。

市販のポリアミン類、または前記製造法を組み合わせるポリオール類より調製したポリアミン類にポリアルキレングリコール類 Ax のカーボネート誘導体を 3 モル以上反応させて、化合物 (Ifax) を含む粗生成物が得られる。なお、ポリアルキレングリコール類 Ax のカーボネート誘導体は、Talia Miron らの方法 [バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、4 巻、568 頁 (1993 年)] に従って製造することができる。また、ポリアルキレングリコール類 Ax のカーボネー

ト誘導体としては、N-ヒドロキシスクシンイミジルカーボネート、p-ニトロフェニルカーボネート、イミダゾリルカルボニルオキシ誘導体等を利用することができる。

化合物 (Ix) のうち、 $X^{1x}$ が $R^{4x}\text{-NH-C(=O)-O}$  (式中、 $R^{4x}$ は前記と同義である) である化合物 (Ifbx) は、例えば以下のようにして製造することができる。

化合物 (Ifbx) はポリオール類のカーボネート誘導体とポリアルキレングリコール類Axのアミノ誘導体とを上記と同様に反応させることによって得ることができる。

他の製造法に準じて官能基の保護、脱保護を組み合わせることによって、化合物 (Ifax) または化合物 (Ifbx) を選択的に生成させることもできる。

各工程の反応条件、精製条件はこれまでの製造法に記載した方法に準じる。

#### 製造法 6 x - 1

化合物 (Ifx) のうち、 $R^{2x}$ がカルボキシ、カルバモイル、シアノ、アミノ、マレイミド、ホルミル、ハロゲン化カルボニル、ハロゲン化低級アルキル、イソシアナート、イソチオシアナート、スクシンイミドオキシカルボニル、置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニル、ベンゾトリアゾリルオキシカルボニル、フタルイミドオキシカルボニル、ビニルスルホニル、置換もしくは非置換の低級アルコキシカルボニルオキシまたは置換もしくは非置換のアリールオキシカルボニルオキシである化合物は、化合物 (Ifx) を製造法 6 x に従って合成した後、製造法 1 x - 1 ~ 製造法 1 x - 9 に記載された方法を組み合わせて調製することができる。

$R^{1x}\text{-(Mx)}_{nx}\text{-X}^{1x}$ をLxに結合して1本鎖化合物あるいは2本鎖化合物を取得し、同様の反応で前記と同一または異なる $R^{1x}\text{-(Mx)}_{nx}\text{-X}^{1x}$ をLxに結合して、3本鎖以上の化合物を取得することもできる。例えば、製造法 1 x ~ 製造法 6 x に示した方法のうちいずれかの反応を利用してLx中の1個所あるいは2個所の官能基にポリアルキレングリコール類を結合させ、1本鎖あるいは2本鎖化合物を得る。生成する1本鎖あるいは2本鎖化合物の割合は、反応に使用するポリアルキレングリコール類と、

Lx部分の構造を構築する原料の比を変えることで調節することができ、1本鎖あるいは2本鎖化合物を主成分にすることも可能である。得られた1本鎖あるいは2本鎖化合物はそのままの純度で、あるいは製造法1xに示した方法に準じてポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度に、あるいは高純度に精製して次のステップに使用することができる。

このようにして得られた1本鎖あるいは2本鎖化合物と、前記と同一または異なるポリアルキレングリコール類を製造法1x～製造法6xに示したいずれかの方法に準じて結合して、3本鎖以上の化合物が調製できる。なお、3本鎖以上のポリアルキレングリコール類は1本鎖あるいは2本鎖化合物を取得した反応と同様の反応に付すこともできるが、異なる反応に付し異なる結合様式を有するように調製してもよい。例えば、水酸基、アミノ、カルボキシ等の複数の官能基を有する化合物をLx部分の構造を構築する原料に使用する場合、製造法1xに示した方法で $X^{1x}$ がOである1本鎖あるいは2本鎖化合物をまず取得し、次いで製造法4xに示した方法で3本鎖以上のポリアルキレングリコール類を $X^{1x}$ が $R^{4x}\text{-NH-C(=O)-R}^{5x}$ となるように反応させることができる。以上のように製造法1x～6xの組合わせて複数のポリアルキレングリコール類が同一または異なる結合様式でLxに結合した3本鎖以上の化合物を得ることができる。さらに、使用するポリアルキレングリコール類は各反応の段階で分子量が異なってもよく、各々のポリアルキレングリコール類をLxに結合させる反応で異なる平均分子量のポリアルキレングリコール類を使用することで容易に目的物が得られる。

また、Lxにポリアルキレングリコール類を導入する反応において、Lx中の1個所以上の官能基（例えば製造法1xの場合、1個所以上の水酸基）を残し、他の官能基を適当な保護基で保護してから、ポリアルキレングリコール類と反応、結合させ、その後、保護基を除去することも可能である。

本発明のポリアルキレングリコール類は、上記製造法で具体的に示された化合物以外であっても、上記製造法に準じて得ることができる。

なお、先にも述べたとおり、製造法1x～6xの各工程において、原料に用いるポリアルキレングリコール類は市販のものをを用いることもできるが、Samuel



Zalipskyによってまとめられた各種の方法[バイオコンジュゲート ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、6巻、150頁 (1995年)]等によって容易に製造することも可能である。

得られたポリアルキレングリコール類はシリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、再結晶、抽出等の方法によって、ポリアルキレングリコール類の分岐数に応じて任意の純度の分岐型ポリアルキレングリコール類に精製することができる。

得られた分岐型ポリアルキレングリコール類は前記生理活性ポリペプチドのアミノ酸側鎖、N末端アミノ基またはC末端カルボキシル基に直接、あるいはスパーサーを介して結合させることができる。

スパーサーとしてはアミノ酸やペプチドが好ましいが、ポリアルキレングリコール類を結合することができればそれ以外であってもよい。アミノ酸としてはリジン、システイン等の天然アミノ酸等を用いることができ、オルニチン、ジアミノプロピオン酸、ホモシステイン等を用いることもできる。より好ましくは、システインがあげられる。ペプチドとしては、アミノ酸残基2~10からなるものが好ましい。アミノ酸、ペプチド以外のスパーサーとしては、グリセロール、エチレングリコール、糖等があげられる。ここで、糖としては、グルコース、ガラクトース、ソルボース、ガラクトサミン、ラクトース等の単糖類や二糖類等があげられる。

これらのスパーサーは、生理活性ポリペプチド分子中のリジン、システイン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン等の残基の側鎖とアミド結合、チオエーテル結合、エステル結合等を介して結合するか、該ポリペプチドのC末端カルボキシル基とアミド結合やエステル結合するかペプチドのN末端アミノ基とアミド結合する。これらの結合は、通常のペプチド合成法[泉屋ら、ペプチド合成の基礎と実験 (1985年)、丸善]や遺伝子組換え法を用いて行うことができる。

この場合、生理活性ポリペプチドを合成すると同時にC末端カルボキシル基にスパーサーとなるアミノ酸、ペプチド等を導入することが望ましいが、生理活

性ポリペプチドを合成した後にスペーサーを結合してもよい。また、該ポリペプチドのC末端カルボキシル基等を化学合成的に活性化してスペーサーに結合することもできる。また、ポリアルキレングリコール類を予め結合したスペーサーを前記の方法で生理活性ポリペプチドに結合することもできる。

本発明で使用する抗体は、公知の手段〔アンティボディーズ ア ラボラトリー マニュアル、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) (1988年)〕を用いてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる。

本発明で使用する抗体として、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましい。

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマが産生する抗体、ヒト化抗体、およびそれらの抗体断片等があげられる。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体等があげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖可変領域（以下、重鎖はH鎖として、可変領域はV領域としてHVまたはVHとも称す）および軽鎖可変領域（以下、軽鎖はL鎖としてLVまたはVLとも称す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、定常領域はC領域としてCHとも称す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CLとも称す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビット等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であればいかなるものも用いることができる。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のH鎖、L鎖のV領域のCDRのアミノ酸配列をヒトの抗体のH鎖、L鎖のV領域の適切な位置に移植した抗体を意味する。

抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体、ジスルフィド安定化V領域断片、相補性決定領域を含むペプチド等があげられる。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パバインで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

Fab'は、上記F(ab')<sub>2</sub>のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

F(ab')<sub>2</sub>は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

一本鎖抗体（以下、scFvとも称す）は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー（以下、Pと称す）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用されるscFvに含まれるVHおよびVLとしては、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

ジスルフィド安定化V領域断片（以下、dsFvとも称す）は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法[プロテイン エンジニアリング(Protein Engineering) 7巻、697頁（1994年）]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLとしてはモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明で使用される化学修飾ポリペプチドとしては、インターフェロン類を化学修飾した化学修飾ポリペプチドが好ましく、この化学修飾ポリペプチドを含有する医薬も好ましい。また、インターフェロン類を化学修飾した化学修飾ポリペプチドを含有する医薬としては、インターフェロン類を化学修飾した化学修飾ポリペプチドを含有する多発性硬化症治療薬、肝炎治療薬、血管新生が関与する疾患の治療薬、悪性腫瘍治療薬、眼疾患治療薬、皮膚疾患治療薬等があげられるが、好ましいのは多発性硬化症治療薬である。

本発明の化学修飾ポリペプチドを含有する軟膏剤は、通常の軟膏剤調製法によって製造することができる。例えば、軟膏基剤としては水溶性薬剤の軟膏が調製可能なマクロゴール、ソルベース等の親水性基剤、親水軟膏、親水ワセリン、親

水プラスチックベース、精製ラノリン等の乳剤性基剤、ベントナイト、ビーガム、澱粉糊、アルギン酸ナトリウム等の無脂肪性基剤等を用いることができ、これらの軟膏基剤に化学修飾ポリペプチド水溶液、懸濁液、またはこれらの凍結乾燥粉末を0.0000001～10%の重量比で混合し、文献[「薬剤学」(瀬崎ら)、平成4年発行、廣川書店]等々に示された通常の軟膏剤の調製方法に従って練合することで調製される。これらの剤形には通常用いられる緩衝剤、賦形剤、pH調整剤、安定化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、滑沢剤、甘味剤、着色剤、酸化防止剤等の慣用の添加剤を添加して用いることもできる。

投与方法としては経皮的に、あるいは経粘膜的に本発明の軟膏剤を塗布する方法か、または他の許容される方法が可能であり、投与に適する組成物を用いることができる。また軟膏剤中の化学修飾ポリペプチドの配合量は疾患の種類、患者の状態等の条件によって異なるが、化学修飾ポリペプチド中の生理活性ポリペプチドが、軟膏剤1g中に0.0000001%～10% (重量比) で含まれていることが好ましい。

#### 図面の簡単な説明

図1は化学修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の親水軟膏剤中での安定化効果を示す。図1において、符号(—◆—、—■—)は各々下記の意味を表す。

- ◆—：未修飾rhIFN- $\beta$ におけるrhIFN- $\beta$ の残存量の変化
- ：5CHTM(2EA)-rhIFN- $\beta$ におけるrhIFN- $\beta$ の残存量の変化

図2は化学的に修飾されたウシCu, Zn型スーパーオキシドディスムターゼのマクロゴール軟膏剤中での安定化効果を示す。図2において符号(—△—、—○—、—□—、—●—)は各々下記の意味を表す。

- △—：化学的に修飾されたbSOD (5CHTM(2EA)-bSOD) を含有するマクロゴール軟膏剤
- ：bSODにマクロゴールを混合した軟膏剤
- ：bSODとmPEGを混合したものにマクロゴールを混合した軟膏剤

—●— : bSOD水溶液

図3は組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体のマクロゴール軟膏剤中での安定化効果 (SDS-PAGE) を示す。図3において番号 (①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧) は各々下記の意味を表す。縦軸は分子量を表す。

- ① : 分子量マーカー
- ② : G-CSF誘導体水溶液
- ③ : 軟膏剤調製直後
- ④ : 室温1時間後
- ⑤ : 室温1日後
- ⑥ : 室温2日後
- ⑦ : 室温3日後
- ⑧ : 室温7日後

図4は化学的に修飾された組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体のマクロゴール軟膏剤中での安定化効果 (SDS-PAGE) を示す。図4において番号 (①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧) は各々下記の意味を表す。縦軸は分子量を表す。

- ① : 分子量マーカー
- ② : 化学修飾G-CSF誘導体水溶液
- ③ : 軟膏剤調製直後
- ④ : 室温1時間後
- ⑤ : 室温1日後
- ⑥ : 室温2日後
- ⑦ : 室温3日後
- ⑧ : 室温7日後

図5は組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の親水軟膏剤中での37℃における安定化効果 (SDS-PAGE) を示す。図5において番号 (①、②、③、④、

⑤、⑥、⑦、⑧、⑨) は各々下記の意味を表す。縦軸は分子量を表す。

- ① : 分子量マーカー
- ② : G-CSF誘導体水溶液
- ③ : 軟膏剤調製直後
- ④ : 37°C30分後
- ⑤ : 37°C1時間後
- ⑥ : 37°C2時間後
- ⑦ : 37°C4時間後
- ⑧ : 37°C8時間後
- ⑨ : 37°C24時間後

図6は化学的に修飾された組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の親水軟膏剤中での37°Cにおける安定化効果 (SDS-PAGE) を示す。図6において番号 (①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧、⑨) は各々下記の意味を表す。縦軸は分子量を表す。

- ① : 分子量マーカー
- ② : 化学修飾G-CSF誘導体水溶液
- ③ : 軟膏剤調製直後
- ④ : 37°C30分後
- ⑤ : 37°C1時間後
- ⑥ : 37°C2時間後
- ⑦ : 37°C4時間後
- ⑧ : 37°C8時間後
- ⑨ : 37°C24時間後

図7は組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の親水軟膏剤中での室温における安定化効果 (SDS-PAGE) を示す。図7において番号 (①、②、③、④、⑤、⑥) は各々下記の意味を表す。縦軸は分子量を表す。

- ①：分子量マーカー
- ②：G-CSF誘導体水溶液
- ③：軟膏剤調製直後
- ④：室温10日後
- ⑤：室温20日後
- ⑥：室温30日後

図8は化学的に修飾された組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の親水軟膏剤中での室温における安定化効果（SDS-PAGE）を示す。図8において番号（①、②、③、④、⑤、⑥）は各々下記の意味を表す。縦軸は分子量を表す。

- ①：分子量マーカー
- ②：化学修飾G-CSF誘導体水溶液
- ③：軟膏剤調製直後
- ④：室温10日後
- ⑤：室温20日後
- ⑥：室温30日後

#### 発明を実施するための最良の形態

以下の実施例は本発明を具体的に説明するものであり、本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきでない。実施例中の略号は特に断らない限り、それぞれ以下のことを意味する。なお、本明細書において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会（IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature）の勧告〔ヨーロッパジャーナルオブバイオケミストリー（Eur. J. Biochem.）、138巻、9頁（1984年）〕に従った。

HPLC：High Performance Liquid Chromatography

MALDI-TOF MS：Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass

FAB MS：Fast Atom Bombered Mass

UV：Ultra Violet

RI : Refractive Index

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

ELISA: 酵素免疫測定法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

SDS-PAGE: ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

PEG: ポリエチレングリコール (polyethylene glycol)

mPEG: モノメトキシポリエチレングリコール (monomethoxy polyethylene glycol)

IFN: インターフェロン (interferon)

hIFN: ヒトインターフェロン (human interferon)

rhIFN: 組換えヒトインターフェロン (recombinant human interferon)

G-CSF: 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor)

rhG-CSF: 組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子 (recombinant human granulocyte-colony stimulating factor)

SOD: スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase)

bSOD: ウシスーパーオキシドディスムターゼ (bovine superoxide dismutase)

hSOD: ヒトスーパーオキシドディスムターゼ (human superoxide dismutase)

DSC: N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート (N,N'-disuccinimidyl carbonate)

TEA: トリエチルアミン (triethylamine)

DMF: N,N'-ジメチルホルムアミド (N,N'-dimethylformamide)

DMSO: ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide)

NHS: N-ヒドロキシスクシンイミド (N-hydroxysuccinimide)

Ts: p-トルエンスルホニル (p-toluenesulfonyl)

TsCl: p-塩化スルホニルトルエン (p-toluenesulfonylchloride)

DMAP: ジメチルアミノピリジン (dimethylaminopyridine)

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩 (benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (N-hydroxybenzotriazole)

DCC: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide)



LAH: 水素化アルミニウムリチウム (lithium aluminium hydride)

NMM: N-メチルモルホリン (N-methylmorpholine)

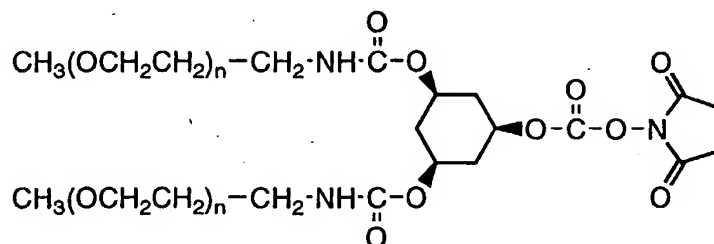
TFA: トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)

CDI: N, N'-カルボニルジイミダゾール (N, N'-carbonyldiimidazole)

実施例1 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTO(2UU)

構造:



cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリオール二水和物 (cis,cis-1,3,5-cyclohexanetriol dihydrate) (Fluka社製) 420.5mg (2.5mmol) およびDSC 3.2g (12.5mmol) を、アルゴン気流中、アセトニトリル20mlに溶解し、TEA 2.1ml (12.5mmol) を加え、室温で一昼夜攪拌した。溶媒を減圧下除去し、クロロホルムおよび0.1mol/L塩酸を加えて抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去し、cis,cis-1,3,5-トリス (スクシンイミジルオキシカルボニルオキシ) シクロヘキサン [cis,cis-1,3,5-tris(succinimidyl oxycarbonyloxy) cyclohexane] 357mg (0.64mmol) を得た (収率: 25.7%)。

次に、モノメトキシポリエチレングリコールプロピルアミン (monomethoxy polyethylene glycol propylamine) (mPEG-NH<sub>2</sub>) [平均分子量5,000、日本油脂(株)製] 500mg (0.1mmol)、および上記のcis,cis-1,3,5-トリス (スクシンイミジルオキシカルボニルオキシ) シクロヘキサンを塩化メチレン12.5mlに溶解し、TEA 28μl

を加え、室温で2時間攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、残渣を472mg取得した(収率94.4%)。そのうち、372mgを逆相HPLCで精製した。カラムにはTSK gel ODS120-T (30mm×250mm) (東ソー)を用い、0.1%TFA水溶液を移動相として、10ml/分の流量で流し、0~90%のアセトニトリルの直線濃度勾配で溶出させた。平均分子量10,000の目的の画分30mlを回収し、減圧下アセトニトリルを除去し、クロロホルムで抽出した。これをジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を濾取し減圧乾燥して目的物121.7mgを得た(回収率32.7%)。

<ゲル濾過HPLC分析>

移動相: 150mmol/L塩化ナトリウム、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5)

流量: 0.7ml/分

検出: RI

分離カラム: TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub> (7.8×300mm) (東ソー)

カラム温度: 室温

保持時間: 12.2分

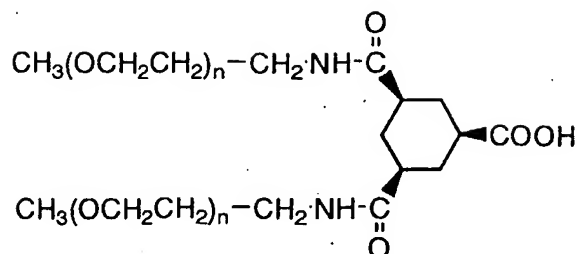
<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 3.61(s, 8nH), 3.41(s, 6H), 4.69(br, 4H), 1.77(brm, 4H), 5.30(br, 2H), 0.8-3.4(m, 9H), 2.84(s, 4H)

実施例2 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTC(2AA)

構造:



84.0mg (0.388mmol) のcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 (cis,cis-1,3,5-cyclohexane tricarboxylic acid) (Fluka社製) をDMF 50mlに溶解し、270.2mg (2.0mmol) のHOBtおよび1.04g (2.0mmol) のPyBOPを加えて0℃で30分間攪拌した。5g (1.0mmol) のモノメトキシポリエチレングリコールプロピルアミン [平均分子量5,000、日本油脂(株)製]、続いて219.7μl (1.9mmol) のNMMを加え、一昼夜攪拌した。1mol/Lの塩酸でpH1~2に調整し、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、ジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を回収し、目的の化合物を含む粗生成物を3.78g (収率75.6%) 取得した。次に、300mlのDEAE-Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。水に溶解した粗生成物をカラムに添加し、さらに水600mlでカラムを洗浄した後、0.6~1.2mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出した。その後、目的物の画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧下除去して目的物を610.4mg (収率65.2%) 取得した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い実施例1と同様にして分析した。

保持時間：12.0分

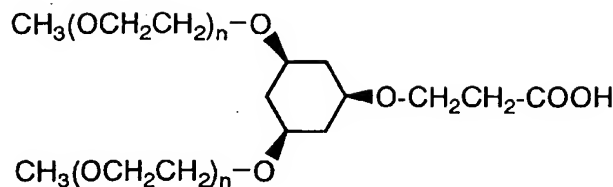
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 1.56(m, 3H), 2.1-2.5(m, 6H), 1.77(m, 4H), 2.1-2.3(br, 4H), 3.38(br, 4H), 3.64(s, 8nH), 3.36(s, 6H), 6.46(t, J=5.23Hz, 2H)

実施例3 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号 : 5CHTO(2EA)

構造 :



mPEG [平均分子量5,000、日本油脂 (株) 製] 50g (10mmol) を150mlのトルエンに溶解し、脱水還流した。TEA3.5ml (25mmol) を滴下し、1時間かけて、臭化チオニル (1.55ml) をあらかじめトルエン (13.6ml) に溶解した溶液を滴下した。1時間還流した後、セライトを用いて濾過し、4時間室温で静置した。次に50℃に加熱して活性炭を5g加えた。セライトを用いて活性炭を除去し、4℃で1昼夜静置した。翌日、上清を除去した後、残渣を60℃のエタノール250mlへ溶解した。そこへ3gの活性炭を加え、セライトを用いて活性炭を除去した後、4℃で一昼夜静置した。翌日、残渣を冷エタノールとジエチルエーテルで洗浄し、乾燥した後、臭素化したmPEG (mPEG-Br) を32.87g (収率65.74%) 取得した。

<  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 3.64(s, 4nH), 3.38(s, 3H), 3.48(t, J=6.3Hz, 2H), 3.81(t, J=6.3Hz, 2H)

cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリオール二水和物 (cis,cis-1,3,5-cyclohexanetriol dihydrate) 1.322g (10mmol) を十分乾燥後、無水DMF25mlに溶解し、アルゴン気流中、水素化ナトリウム0.48g (11mmol) へ滴下し、30分間攪拌した。そこへDMF25mlに溶解した上記のmPEG-Br10g (2mmol) を滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、沈殿を減圧下乾燥した。次に、乾燥した粉末を適量の水に溶解し、1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少

量の塩化メチレンに溶解し、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥してmPEGがシクロヘキサントリオール (cyclohexanetriol) に1分子結合した1本鎖型粗生成物を7.5g (収率75.0%) 取得した。

得られた粗生成物5gにトルエン50mlを加え、一昼夜脱水還流を行った。また、mPEG-Br 5.5g (1.1mmol) をトルエン50mlに溶解し、160°Cで一昼夜脱水還流を行った。次に、上記粗生成物のトルエン溶液に水素化ナトリウム144mg (3.3mmol) を加え、30分間攪拌した後、mPEG-Brのトルエン溶液を滴下し、一昼夜脱水還流を行った後、濾過して不溶物を除去し、減圧下乾燥した。1mol/L塩酸を加えてpH1~2に調整し、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧下除去し、残渣に塩化メチレン少量を加えて溶解した後、ジエチルエーテルに滴下した。生成した白色沈殿を減圧乾燥し、目的の化合物を含む粗生成物を7.73g (収率73.6%) 取得した。

粗生成物1.5gを8%水酸化カリウム水溶液に溶解した後、アクリルアミド150mg (2.11mmol) を添加し、室温で7時間攪拌した。さらにアクリルアミド150mg (2.11mmol) を添加し、室温で4日間攪拌した。反応液を1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を塩化メチレンに溶解後、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾別し、減圧乾燥して粗目的物1.017g (67.8%) を得た。

60mlのDEAE-Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) に添加し、0.4~1.4mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液で溶出した。目的物を含む画分をクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後溶媒を減圧除去し、目的物を52mg取得した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間: 12.7分

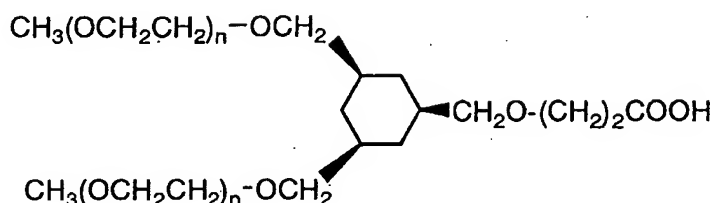
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 2.59(t, J=16.0Hz, 2H), 0.8-3.4(m, 9H), 3.64(s, 8nH), 3.38(s, 6H)

# 実施例4 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：5CHTM(2EA)

構造：



mPEG [平均分子量5,000、日本油脂（株）製] 400g (80mmol) をトルエン1Lおよび塩化メチレン500mlの混合溶媒に溶解した。TsCl 50g、次いでTEA 46.4mlを加え、室温で8時間攪拌した。次にTsCl 50gを添加し、16時間攪拌した。不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣を少量のクロロホルムに溶解して、ジエチルエーテル中に滴下した。生成した白色沈殿を回収し、減圧下で乾燥してトシルエステル化mPEG (mPEG-OTs) 344gを得た (収率86.0%)。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 2.45(s, 3H), 3.38(s, 3H), 3.70(s, 4nH), 4.16(t, J=5.0Hz, 2H), 7.34(d, J=6.8Hz, 2H), 7.80(d, J=8.1Hz, 2H)

mPEG-OTs 344gをDMF 1Lに溶解後、ヨウ化ナトリウム54gを加え、80～90℃で1時間攪拌した。不溶物を濾別し、濾液をジエチルエーテル中に滴下した。生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。残渣を10%チオ硫酸ナトリウム水溶液1.5Lに溶解し、しばらく攪拌した後、クロロホルムで抽出した。溶媒を減圧除去し、ヨウ素化したmPEG (mPEG-I) 314gを得た (収率78.5%)。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 3.27(t, J=6.9Hz, 2H), 3.38(s, 3H), 3.67(s, 4nH)

40gのcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸 (Fluka社製) をn-プロパノール1Lおよび濃硫酸20mlに溶解し、室温で72時間攪拌した。その後、反応液に適当量の酢酸エチルを添加し、続いて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下除去し、cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸n-プロピルエステル (cis,cis-1,3,5-cyclohexane tricarboxylic acid npropyl ester) 72.4g (収率：定量的) を得た。

<  $^1\text{H-NMR}$ 分析 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 0.94(t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 9H), 1.65(m, 6H), 4.05(t,  $J=6.6\text{Hz}$ , 6H), 1.56, 2.25, 2.40( 各々m, 計9H)

1.19gのLAHを50mlのジエチルエーテルに溶解後、アルゴン雰囲気下、cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリカルボン酸n-プロピルエステル3.2gのジエチルエーテル溶液12.5mlを滴下した。さらに攪拌しながら41時間還流した。次いで、水2.5mlを滴下し、そのまま15分間攪拌した。さらにエタノール5mlを滴下し、室温で3時間攪拌した。反応液を濾過し、不溶物を沸騰エタノールで抽出した。このエタノール溶液を先程の濾液と合わせ、溶媒を減圧下除去した。得られた残渣を沸騰1,4-ジオキサンで抽出した後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下除去し、cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール (cis,cis-1,3,5-cyclohexane trimethanol) 1.50g (収率91.7%) を得た。

< 質量分析 (FAB-MS) >

実測値:  $(\text{M}+\text{H})^+$  175

理論値:  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_3=174$

<  $^1\text{H-NMR}$ 分析 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 3.21(t,  $J=5.9\text{Hz}$ , 6H), 4.35(t,  $J=5.1\text{Hz}$ , 3H), 0.43, 1.40, 1.75( 各々m, 計9H)

cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール2.5g (14mmol) を乾燥DMF 10mlに溶解し、0°C、アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム2.28g (46.2mmol) へ滴下し、

30分間攪拌した。そこへDMF 50mlに溶解した40g (8mmol) のmPEG-Iを滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧下乾燥させた。次に、乾燥させた上記の沈殿を適量の水に溶解し、1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解後、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥して、mPEGがcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールに2分子結合した2本鎖型粗生成物33.0g (83.0%)を得た。

この粗生成物14.0gを8%水酸化カリウム水溶液に溶解した後、アクリルアミド1.18g (16.7mmol) を添加し、室温で7時間攪拌した。さらにアクリルアミド1.18g (16.7mmol) を添加し、室温で4日間攪拌した。反応液を1mol/L塩酸でpH3に調整し、クロロホルムで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解後、ジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗生成物10.2g (73%)を得た。この粗生成物を1000mlのDEAE Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて精製した。溶出は0.4~100mmol/Lの塩化ナトリウム水溶液で行った。目的物を含む画分をクロロホルムで抽出し、クロロホルム層から減圧下溶媒除去し、残渣をジエチルエーテルで沈殿させて目的物を500mg得た。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：12.7分

#### <<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

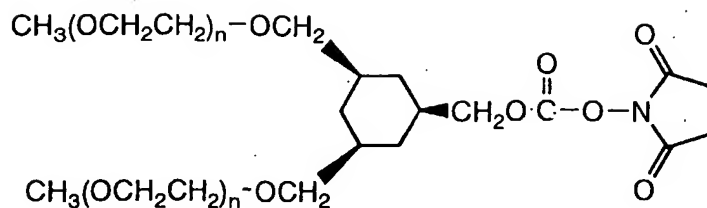
δ (ppm): 3.38(s, 6H), 3.64(s, 8nH), 0.85, 1.26(各々m, 計9H)

実施例5 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：SCHTM(2EU)

構造：





実施例4と同様にして、mPEGがシクロヘキサントリメタノールに2分子結合した2本鎖粗生成物を取得した。この粗生成物2.7gを実施例1に示したTSK gel ODS120-Tカラムを用いた逆相HPLCで精製し、2本鎖PEG誘導体のみを含む画分を回収した。この画分から減圧下、アセトニトリルを除去し、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧乾燥し227mgの2本鎖PEG誘導体を得た（粗生成物からの収率8.4%）。2本鎖PEG誘導体20mg（2 $\mu$ mol）を減圧乾燥し、1.2mg（10 $\mu$ mol）のDMAPおよび2.6mg（10 $\mu$ mol）のDSCを加え、塩化メチレンを1ml添加してアルゴン気流中室温で6時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液をジエチルエーテル中に滴下した。生成した沈殿を回収し、減圧乾燥して、目的物を15mg得た（収率75%）。

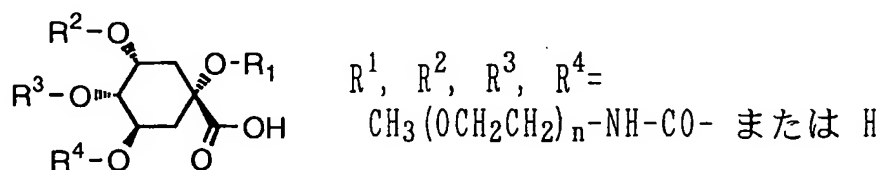
< $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 0.5-2.0(m, 9H), 2.84(s, 4H), 3.61(s, 8nH), 3.41(s, 6H)

実施例6 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：5QNA(2UA)、5QNA(3UA)、5QNA(4UA)

構造：



（式中、化合物5QNA(2UA)においては $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ のうち2つが

$\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ であり、残りの2つが水素原子である。化合物5QNA(3UA)においては $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ のうち3つが $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ であり、残りの1つが水素原子である。化合物5QNA(4UA)においては $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ の全てが $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ である)

3mgの(1R, 3R, 4R, 5R) -(-)キナ酸 (Quinic acid) を乾燥DMF 250 $\mu$ lに溶解した後、17 $\mu$ lのトリエチルアミン、触媒量のCuClを添加した。さらに344mgのmPEG-NCO (平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc.製、構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N=C=O}$ ) を添加し、室温で1時間攪拌した。10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗目的物306mg (88%)を得た。DEAE Sepharose F. F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いて、実施例2と同様にして精製した。目的画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧除去して以下の化合物を得た。

化合物5QNA(2UA)の収量は36mg (収率10.5%) でありゲル濾過HPLCでの保持時間は12.4分であった。化合物5QNA(3UA)の収量は24mg (収率10.2%) でありゲル濾過HPLCでの保持時間は11.7分であった。化合物5QNA(4UA) の収量は17mg (収率5.4%) でありゲル濾過HPLCでの保持時間は11.1分であった。なおゲル濾過HPLCはTSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

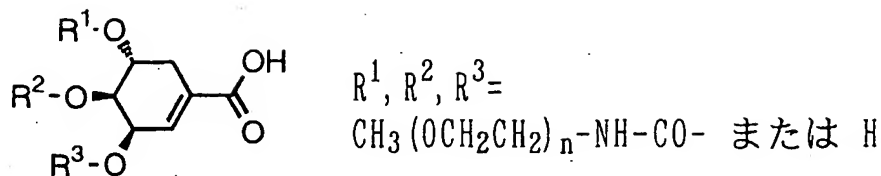
< $^1\text{H-NMR}$ 分析 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 5.7-4.8(m, 3H), 3.33(s, 6Hまたは9Hまたは12H), 3.64(s, 8nHまたは12nHまたは16nH)

実施例7 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキセン誘導体の合成

略号: 5SKA(2UA)、5SKA(3UA)

構造:



(式中、化合物5SKA(2UA)においては $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ のうち2つが $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ であり、残りの1つが水素原子である。化合物5SKA(3UA)においては $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ の全てが $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ である)

3.2mgのシキミ酸を乾燥DMF 250 $\mu$ lに溶解した後、15 $\mu$ lのトリエチルアミン、触媒量のCuClを添加した。さらに300mgのmPEG-NCO（平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc.製、構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N=C=O}$ ）を添加し、室温で1時間攪拌した。10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して粗目的物270mg（89%）を得た。DEAE Sepharose F. F.カラム

（Amersham-Pharmacia Biotech社）を用いて、実施例2と同様にして精製した。目的画分をクロロホルムで抽出し、溶媒を減圧除去して目的化合物を得た。

化合物5SKA(2UA)の収量は4mg（収率1.3%）でありゲル濾過HPLCでの保持時間は12.4分であった。化合物5SKA(3UA)の収量は18mg（収率6.0%）でありゲル濾過HPLCでの保持時間は11.7分であった。なおゲル濾過HPLCはTSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

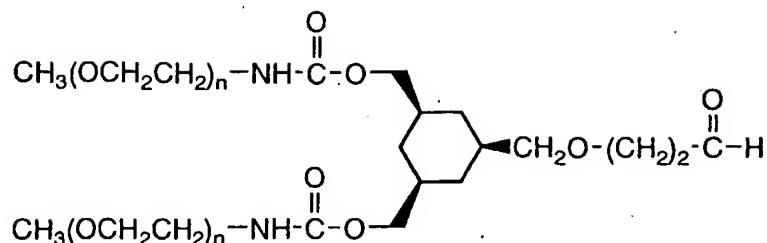
<  $^1\text{H-NMR}$ 分析 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 6.6-5.1(m, 4H), 3.33(s, 6Hまたは9H), 3.64(s, 8nHまたは12nH)

実施例8 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号: 5CHTM(2URa)

構造:



実施例4と同様にして合成した *cis,cis*-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール50mgを脱水DMF 0.5mlに溶解した後、水素化ナトリウム17mgを添加し、0°Cで15分間攪拌した。3-プロモプロピオンアルデヒドジメチルアセタール47 $\mu$ lを添加し、室温で16時間攪拌した。シリカゲルカラムで精製し、*cis,cis*-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールの1位にプロピオンアルデヒドジメチルアセタール (propionaldehyde dimethylacetal) が結合した化合物を15mg得た (収率38%)。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 0.62(m, 9H), 1.54-1.88(m, 9H), 1.83(q, J=6.20Hz, 2H), 3.27(d, J=6.30Hz, 2H), 3.33(s, 6H), 3.39(d, J=6.30Hz, 4H), 3.46(t, J=6.20Hz, 2H), 4.51(t, J= 5.70Hz, 1H)

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値: (M+H)<sup>+</sup> 277

理論値: C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub> = 276

得られた化合物15mgを脱水DMF 1mlに溶解し、31 $\mu$ lのトリエチルアミン、触媒量のCuClを添加した。598mgのmPEG-NCO (平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc製、構造:  $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N=C=O}$ ) を添加し、室温で2時間攪拌した。溶液を10倍量のジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。得られた白色固体578mgを実施例1と同様な逆相HPLCで精製し、383mgを得た。このうち100mgを70%酢酸水溶液に溶解し、40°Cで16時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応液を中和し、クロロホルムで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下反応液を濃縮した。ジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。逆相HPLC

で再度精製し、目的物を39mg得た（収率41％）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：12.7分

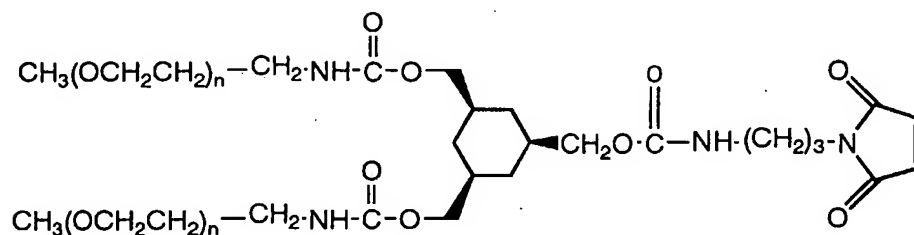
<<sup>1</sup>H-NMR分析（CDCl<sub>3</sub>, 300MHz）>

δ (ppm): 3.38(s, 6H), 9.79(t, J=1.56Hz, 1H), 3.64(s, 8nH)

実施例9 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：5CHTM(2UM)

構造：



実施例4と同様にして合成したcis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール100mgおよびDSC 735mgを約10mlのアセトニトリルに溶解し、DMAP 210mgを加えて室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、塩化メチレンおよび0.1mol/L塩酸を適量加え抽出した。有機層を減圧乾燥し、cis,cis-1,3,5-トリス（スクシンイミジルオキシカルボニルオキシメチル）シクロヘキサン

[cis,cis-1,3,5-tris(succinimidylloxycarbonyloxymethyl)cyclohexane]を333mg得た（収率97％）。

FAB-MS：598(M+H)<sup>+</sup>

得られた化合物30mg (0.05mmol) とmPEG-NH<sub>2</sub> [平均分子量5,000、日本油脂（株）製] 500mg (0.1mmol) を塩化メチレンに溶解し、TEA20μlを加え、室温で2時間

攪拌した。続いて、プロピレンジアミン (propylene diamine) 42  $\mu$ l (0.5mmol) (Aldrich製) を加え、室温でさらに2時間攪拌した。反応液を濾過し濾液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥して430mgの粉末を得た (収率86%)。

得られた粉末425mgを水200mlに溶解し、20mlのSP Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、2本鎖PEGを含む目的画分よりクロロホルムで抽出し、得られた有機層をジエチルエーテルに滴下し、精製した沈殿を減圧乾燥した。得られた沈殿62.5mg (6.25  $\mu$ mol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液0.5mlに溶解し、氷冷下、エトキシカルボニルマレイミド2.1mgを加えて10分間攪拌した。続いて水1.5mlを加え室温で15分間攪拌し、クロロホルムで3回抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を除去し25mgの目的化合物を得た (収率40%)。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様にして分析した。

保持時間：12.4分

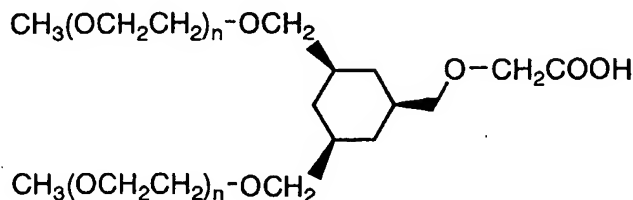
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 0.63-0.75(m, 3H), 1.75-1.78(m, 12H), 3.1-3.3(m, 12H), 3.38(s, 6H), 3.64(s, 8nH), 5.20(br, 3H), 6.73(s, 2H)

実施例10 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-シクロヘキサン誘導体の合成

略号：5CHTM(2EA2)

構造：



実施例4と同様にして合成したcis, cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール100mgを脱水DMSO 23mlに溶解した後、tert-ブトキシカリウムのtert-ブタノール溶液 (1mol/L) 958 mlを添加し、室温で1時間攪拌した。プロモ酢酸tert-ブチルエステルを添加し、90°Cで16時間攪拌した。室温まで放冷した後、シリカゲルカラムで精製し、1-O-tert-ブトキシカルボニルメチル-cis,cis-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール (1-O-tert-butoxycarbonylmethylcis,cis-1,3,5-cyclohexanetrimethanol) を22mg得た (収率13%)。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 0.60(m, 9H), 1.55-1.90(m, 9H), 1.48(s, 9H), 3.36(d, J=6.42Hz, 2H), 3.39 (d, J=6.15Hz, 4H), 3.95(s, 2H)

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値: (M+H)<sup>+</sup> 289

理論値: C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>=288

上記で得られた化合物22mgをアルゴン雰囲気下、脱水ピリジン200μlに溶解し、そこへ塩化トシル (23mg) を溶解した脱水ピリジン200μlを添加した。0°Cで3時間攪拌した後、水を20μl添加し、さらにその後100μl添加した。反応液を氷冷したクロロホルムで抽出し、氷冷した1mol/L塩酸、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液の順で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を除去し、シリカゲルカラムで精製することにより、1-O-tert-ブトキシカルボニルメチル

-3-O,5-O-ジトシル-1,3,5-シクロヘキサントリメタノール

(1-O-tert-butoxycarbonylmethyl3-O,5-O-ditosyl-1,3,5-cyclohexane trimethanol) を22mg得た (収率48%)。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm): 1.26(m, 9H), 1.75(m, 9H), 1.47(s, 9H), 2.46(s, 6H), 3.29(d, J=6.30Hz, 2H), 3.80 (m, 4H), 3.89(s, 2H), 7.36(d, J=8.10Hz, 2H), 7.76(d, J=8.40Hz, 2H)

<質量分析 (FAB-MS) >

実測値：(M-tert-Butyl+2H)<sup>+</sup> 541

理論値：C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>=596

1.4gのmPEG（平均分子量5,000、日本油脂（株）社製）を脱水トルエン2mlに溶解し、アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム26mgへ滴下し、30分間攪拌した。そこへ脱水トルエン500 $\mu$ lに溶解した76mgの1-O-tert-ブトキシカルボニルメチル-3-O,5-O-ジトシル-1,3,5-シクロヘキサントリメタノールを滴下し、室温で一昼夜攪拌した。その後、反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を濾過により回収し、減圧下で乾燥した。得られた白色固体1.2gを120mlのDEAE Sepharose F. F.カラムで実施例2と同様に精製し、目的物を154mgを得た（収率11%）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：12.7分

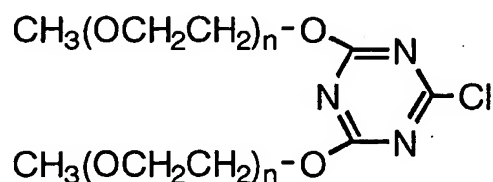
<<sup>1</sup>H-NMR分析（CDCl<sub>3</sub>, 300MHz）>

$\delta$  (ppm): 3.38(s, 6H), 3.64(s, 8nH), 0.58(m, 9H), 1.72-1.93(m, 9H), 3.38(s, 6H)

実施例11 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコールトリアジン誘導体の合成

略号：PEG<sub>2</sub>Cl

構造：



平均分子量5,000のmPEG〔日本油脂（株）社製〕2.0g、酸化亜鉛444mg、乾燥ベンゼン10mlをナスフラスコに入れ、オイルバスで90～95℃に加熱し、初留4mlを除去した。さらに、5時間還流し、室温まで冷却後、塩化シアヌル36mg、モレキュラーシーブス4A 1gを加え、3日間脱水還流した。反応液を冷却後、3,000rpmで遠



心分離し、上清をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を回収し、減圧乾燥した。得られた白色粉末1gを $\gamma$ -アミノ酪酸30mgを含む0.1mol/Lほう酸緩衝液(pH10.0) 10mlに溶解し、4°Cで3日間反応した。1mol/L塩酸を加えてpH1~2に調整した後、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を濃縮し、ジエチルエーテルに滴下して生成した沈殿930mgを回収した。これを930mlの水に溶解し、80mlのDEAE Sepharose F.F.カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。目的画分を回収し、1mol/L塩酸でpH1~2に調整した後、適当量のクロロホルムで抽出し、減圧濃縮した。濃縮液をジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥し、目的物を618mg得た(収率62%)。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様に分析した。

保持時間: 12.4分

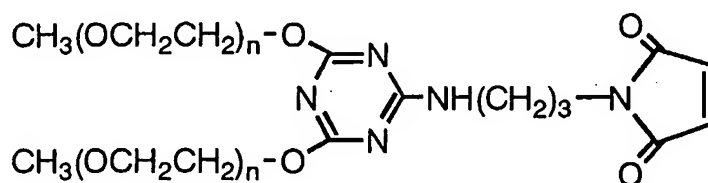
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析 (300MHz) >

$\delta$  (ppm): 2.38(t, 2H, J=6.92Hz), 1.95(m, 2H), 5.66(brt, J=6.33Hz, 1H), 4.43(brm, 2H), 3.38(s, 6H), 3.64(brs, 8nH)

#### 実施例12 6kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコールトリアジン誘導体の合成

略号: PEG<sub>2</sub>Mal

構造:



2.0mlの1,3-ジアミノプロパン (20当量、24mmol) を0.1mol/lのほう酸緩衝液 (pH 10) 600mlに溶解し、実施例11で調製した化合物6gを加えて一昼夜攪拌した。2mol/lの塩酸を加えてpH 1~2に調整し、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下除去し、

残渣に塩化メチレン少量を加えて溶解した後、ジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥して2,4-ビス[メトキシポリ(エチレングリコール)]-6-N-(3-アミノプロピル) アミノ-s-トリアジン {2,4-Bis[methoxy poly(ethylene glycol)]-6-N-(3-aminopropyl)amino-s-triazine} を4.48g得た (収率75%)。

<<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) >

δ (ppm) : 3.64 (s, 8nH) , 3.38 (s, 6H) , 4.44 (brt, 2H, J=5.0Hz) , 4.49 (brt, 2H, J=5.13Hz, ) , 6.02 (brt, 1H, J=5.74Hz) , 2.83 (t, 2H, J=6.47Hz) , 1.71 (m, 2H)

676mg (8mmol) のマレイミドを酢酸エチル40mlに溶解し、氷冷下、N-メチルモルホリン (N-methylmorpholine) を878μl (8mmol) 加え、続いてエトキシカルボニルクロリド (ethoxycarbonyl chloride) 946μl (9.6mmol, 1.2当量) 加えて、30分間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧除去し、酢酸エチル-ジエチルエーテル系で再結晶してN-エトキシカルボニルマレイミド (N-ethoxycarbonyl maleimide) を654mg得た (収率55.6%)。

<<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) >

δ (ppm) : 6.82 (s, 2H) , 4.42 (q, 2H, J=7.00Hz) , 1.42 (t, 3H, J=7.09Hz)

上記で合成した2,4-ビス[メトキシポリ(エチレングリコール)]-6-N-(3-アミノプロピル) アミノ-s-トリアジン {2,4-Bis[methoxy poly(ethylene glycol)]-6-N-(3-aminopropyl)amino-s-triazine} 4.48g (0.448mmol) を氷冷下、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液45mlに溶解し、N-エトキシカルボニルマレイミド (N-ethoxycarbonyl maleimide) 151.5mg (0.90mmol) を加えて0°Cで10分間攪拌した。水を180ml加え、さらに室温で15分間攪拌した。クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧除去した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解し、ジエチルエーテルに滴下した。生成した沈殿を濾取し、減圧乾燥して目的物 {2,4-ビス[メトキシポリ(エチレングリコール)]-6-N-(3-マレイミドプロピル) アミノ-s-トリアジン [2,4-Bis[methoxy poly(ethylene

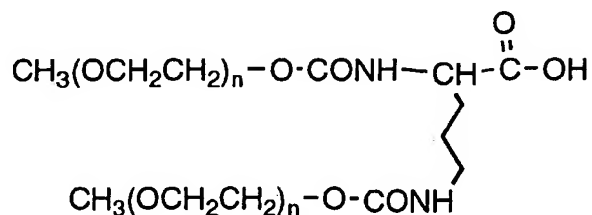
glycol)]-6-N-(3-maleimidopropyl)amino-s-triazine] } を3.9g得た (収率86.7%)。

$\text{< } ^1\text{H-NMR (CDCl}_3, 400\text{MHz) } \text{>}$

$\delta$  (ppm) : 3.66 (s, 8nH) , 3.38 (s, 6H) , 6.73 (s, 2H) , 4.46 (brm, 4H) , 5.76 (brt, 1H, J=5.74Hz) , 2.61 (brt, 2H) , 1.85 (m, 2H)

実施例13 5KDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-オルニチン誘導体の合成  
略号：5ORN(2UA)

構造：



10g (2mmol)のmPEG (平均分子量5,000、日本油脂 (株) 製) を塩化メチレン10ml に溶解し、DSC 2.56g (10mmol) およびDMAP 1.22g (10mmol) を加え、室温で攪拌した。不溶物を濾別し、濾液を200mlのジエチルエーテル中に滴下し、沈殿させた。白色沈殿を濾取して減圧乾燥し、mPEGのSuccinimidylcarbonateを8.6g (収率86.0%) 得た。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

$\delta$  (ppm) : 3.67(s, 4nH), 3.38(s, 3H), 2.84(s, 4H)

次に、オルニチン (Ornithine) 塩酸塩 337.2mg (ナカライテスク製) を 75mmol/L りん酸緩衝液 (pH 7.8) 10nl に溶解し、先に調製した mPEG の Succinimidylcarbonate 1.0g を少しずつ加えて溶解した。1mol/l の水酸化ナトリウム水溶液を加えながら溶液の pH を 7.8 に維持し、室温で一昼夜攪拌した。1mol/l の塩酸で pH3 に調整した後、クロロホルムで抽出した。有機層から減圧下溶媒除去し、残渣を少量の塩化メチレンに溶解してジエチルエーテル中で沈殿させた。白色沈殿を濾取し、mPEG が 1

分子結合したオルニチンを760.2mg得た（収率76.0％）。これを、塩化メチレンに溶解し、先に調製したmPEGのSuccinimidylcarbonate 760.2mgを加え、さらにTEA 21.2μlを加えてアルゴン気流中、室温で一昼夜攪拌した。不溶物を濾別後、減圧下、溶媒を除去し、水50mlを加えて1mol/l塩酸でpH3に調整した。クロロホルムで抽出し減圧濃縮した。残渣を少量の塩化メチレンに溶解してジエチルエーテル中に滴下し、生成した白色沈殿を濾取し1.21gを得た（収率79.6％）。60mlのDEAE Sepharose FFカラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、目的物を416mg取得した（収率34.4％）。

### ＜ゲル濾過HPLC分析＞

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様にして分析した。

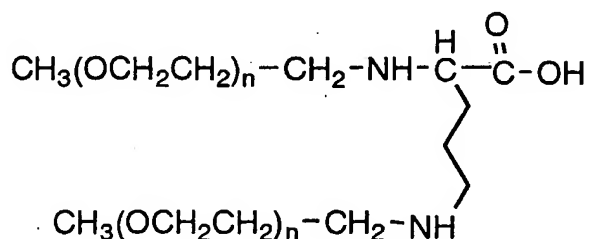
保持時間：12.4分

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

$\delta$  (ppm) : 5.21(br, 1H), 5.57(br, 1H), 4.1-4.4(brm, 4H), 3.64(s, 8nH), 3.38(s, 6H), 1.5-2.0(m, 6H)

実施例14 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-オルニチン誘導体の合成  
略号：5ORN(2RaA)

構造：



オルニチン (Ornithine) 塩酸塩 24mg (0.14mmol) (ナカライテスク製) をメタノール10mlに懸濁し、PEG-アルデヒド (Shearwater Polymers, Inc. 製、平均分子量 5,000) 1.5g (0.3mmol) を加えて室温で攪拌した。ソディウムシアノボロヒドリド

(Sodium Cyanoborohydride) 89.5mg (1.4mmol) を加え、室温で一昼夜攪拌した。  
さらにソディウムシアノボロヒドリド (Sodium Cyanoborohydride) 44.8mg  
(0.7mmol) を追加し、攪拌した。その後、適量の水を加え、減圧下メタノールを  
除去した後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、  
減圧下溶媒を除去し、1.25gの粗生成物を得た (収率83.0%)。

次に、SP-Sepharose FFカラム (120ml、Amersham-Pharmacia Biotech製) を用い  
て精製し、目的物165mgを取得した (収率13.3%)。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様にして分析した。

保持時間：12.4分

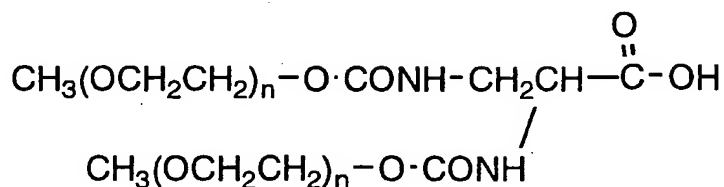
<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm) : 1.6-2.1 (m, 4H) , 3.0-3.3 (m, 6H) , 3.38(s, 6H), 3.64(s, 8nH), 4.68(br, 1H),  
4.72(br, 1H)

実施例15 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール-ジアミノプロピオン酸誘  
導体の合成

略号：5DPA(2UA)

構造：



10g (2mmol)のmPEG (平均分子量5,000、日本油脂 (株) 製) を塩化メチレンに  
溶解し、DSC 2.56g (10mmol) およびDMAP 1.22g (10mmol) を加え、室温で攪拌  
した。不溶物を濾別し、濾液をジエチルエーテル中に滴下した。白色沈殿を濾取  
して減圧乾燥し、mPEGのSuccinimidyl carbonateを8.6g (収率86.0%) 得た。

次に、2,3-ジアミノプロピオン酸塩酸塩 (2,3-Diaminopropionic acid hydrochloride)

281.1mg (2mmol) (ナカライテスク製) を75mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.8) 10ml に溶解し、1mol/l水酸化ナトリウム水溶液でpH 8.5に調整し、先に調製したmPEGのSuccinimidylcarbonate 1.0gを少しずつ加えて溶解した。1mol/L水酸化ナトリウム水溶液を加えながら溶液をpH8.5に維持し、室温で一昼夜攪拌した。1mol/l塩酸でpH 3に調整した後、クロロホルムで抽出した。有機層から減圧下溶媒除去し、mPEGが1分子結合した2,3-ジアミノプロピオン酸を730.0mg得た(収率73.0%)。これを、塩化メチレンに溶解し、先に調製したmPEGのSuccinimidylcarbonate730.0mgを加え、さらにTEA 20.4μlを加えてアルゴン気流中、室温で一昼夜攪拌した。不溶物を濾別後、減圧下、溶媒を除去し、残渣を1.18gを得た(収率80.8%)。60mlのDEAE Sepharose FF(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、目的物を507mg(収率42.9%) 取得した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様にして分析した。

保持時間：12.1分

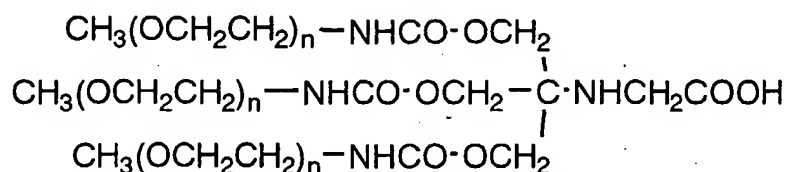
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) >

δ (ppm) : 6.00 (br, 1H) , 5.70 (br, 1H) , 4.1~4.4 (brm, 4H) , 3.64 (s, 8nH) , 3.38 (s, 6H)

#### 実施例16 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコールトリシン誘導体の合成

略号：5TRC(3UA)

構造：



0.5mg (2.8μmol) のトリシン (Tricine) (N-[Tris(hydroxymethyl) methyl]glycine、ナカライテスク社) と50mg (1.0μmol) のmPEG-NCO (Shearwater polymers, Inc.

製、平均分子量5,000、構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-N}=\text{C}=\text{O}$ ）をアルゴン気流下0.5mlのDMFに溶解し、1.4  $\mu\text{l}$  (1.0  $\mu\text{mol}$ ) のTEAを加え、さらに少量の塩化銅を加え、室温で攪拌した。さらに、25mgのmPEG-NCOおよび1  $\mu\text{l}$ のTEAを追加して攪拌した。0.1mol/L塩酸を50ml加えた後、50mlのクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を除去し、粗生成物15mgを取得した（収率20%）。次に、DEAE Sepharose F.F.（Amersham-Pharmacia Biotech社）カラムで精製し、目的物を6.0mg取得した（収率8.0%）。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラム（7.8×300mm）（東ソー）を用い、実施例1と同様に分析した。

保持時間：11.5分

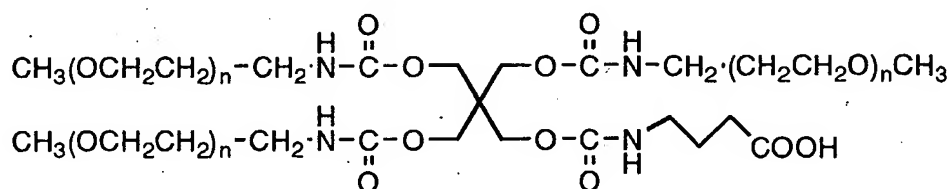
#### < $^1\text{H}$ -NMR分析（ $\text{CDCl}_3$ , 300MHz）>

$\delta$  (ppm) : 3.38 (s, 9H)、3.64 (s, 12nH)、4.10 (s, 6H)、5.43 (br, 3H)

#### 実施例17 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコールーペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3UA)

構造：



ペンタエリスリトール (pentaerythritol) 136mg、DMAP 122mgをアルゴン気流中DMF 5mlに溶解し、CDI 778mgを加え、一昼夜攪拌した。mPEG-NH<sub>2</sub>（平均分子量5,000、日本油脂(株)社製、構造： $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ）5.0gをDMF 10mlに溶解し、前述した反応混合物1.25mlを加え、室温で攪拌した。0.1mol/Lほう酸緩衝液（pH10）100mlに $\gamma$ -アミノ酪酸（ $\gamma$ -aminobutylic acid）2.6gを溶解した溶液を氷冷

し、ここに反応液を注いだ。反応終了後、塩酸でpHを酸性に調整し、クロロホルムで抽出し、残渣を4.2g得た（84.6%）。残渣3.8gを1000mlのDEAE Sepharose（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、目的物を254mg得た（収率6.7%）。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSGelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：11.4分

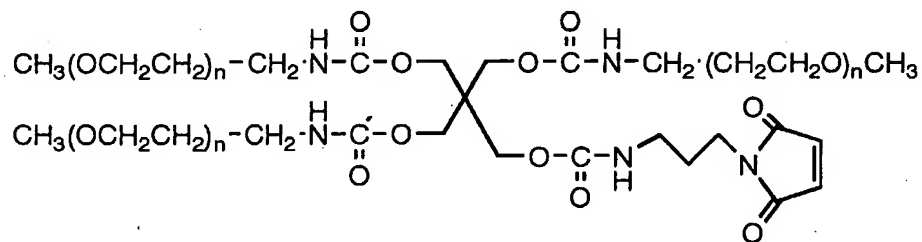
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析（CDCl<sub>3</sub>, 300MHz）>

δ（ppm）： 5.44（brt, J=5.0Hz, 3H）, 5.25（br, 1H）, 4.09（brs, 8H）, 3.65（s, 12nH）, 3.29（s, 9H）, 3.26（m, 8H）, 2.37（t, J=6.8Hz, 2H）, 1.80（brm, 2H）, 1.77（m, 6H）

#### 実施例18 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール-ペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3UM)

構造：



ペンタエリスリトール136mg、DMAP 122mgをDMF 5mlに溶解し、CDI 778mgを加えてアルゴン気流中で一昼夜攪拌した。mPEG-NH<sub>2</sub>（平均分子量5,000、日本油脂(株)社製、構造：CH<sub>3</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>）1.0gをDMF 2mlに溶解し、前述した反応混合物0.25mlを加え、室温で反応させた。続いて187μlのプロピレンジアミンを加えて反応後、ジエチルエーテルを加えた。白色沈殿を回収し、減圧乾燥して残渣975mgを得た（収率97.5%）。この残渣を100mlのSP Sepharose F.F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、白色粉末110mgを得た（収率11.3%）。



次に、この白色粉末100mgを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、0°Cでエトキシカルボニルマレイミド2.3mgを加え、さらに0°Cで10分間攪拌した。水を加え室温で15分間攪拌後、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を減圧濃縮後、ジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を減圧乾燥し、目的物35mgを得た（収率35%）。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：11.3分

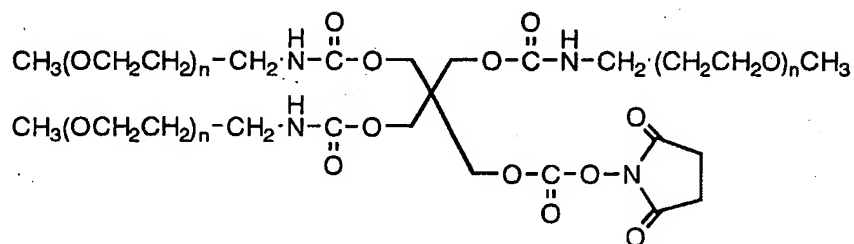
<<sup>1</sup>H-NMR分析（CDCl<sub>3</sub>, 300MHz）>

δ（ppm）： 6.73（s, 2H）, 5.33（br, 3H）, 4.08（brs, 8H）, 3.64（s, 12nH）, 3.36（s, 9H）, 3.25（m, 6H）, 3.11（m, 2H）, 1.77（m, 8H）

実施例19 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール-ペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3UU)

構造：



ペンタエリスリトール136mg、DMAP 122mgをDMF 5mlに溶解し、CDI 681mgを加えて、アルゴン気流中で攪拌した。mPEG-NH<sub>2</sub>（平均分子量5,000、日本油脂(株)社製）1.0gをDMF 2mlに溶解し、前述した反応混合物286μlを加え、室温で反応した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を回収して減圧乾燥し、残渣を1g得た（収率100%）。続いて残渣をTSKgelODS-120Tカラム（30mm×250mm、

東ソー)を用いて精製し、白色粉末を165mg得た(収率16.5%)。

次に、この白色粉末80mgを塩化メチレンに溶解し、DSC 4.1mg、DMAP 2.1mgを加え、アルゴン気流中室温で攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、目的物を63mg得た(収率78.8%)。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：10.7分

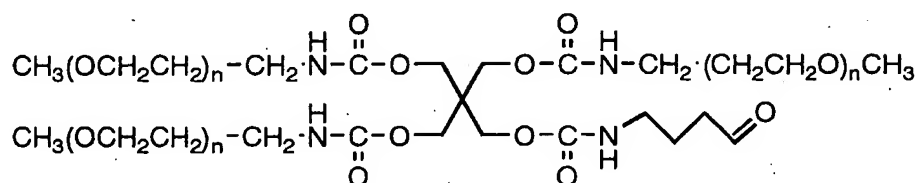
#### <<sup>1</sup>H-NMR分析(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz)>

δ (ppm) : 5.49 (br, 3H) , 4.11 (brs, 8H) , 3.64 (s, 12nH) , 3.38 (s, 9H) , 3.25 (m, 6H) , 2.87 (s, 4H) , 1.78 (m, 8H)

実施例20 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール-ペンタエリスリトール誘導体の合成

略号：5PET(3URa)

構造：



ペンタエリスリトール136mg、DMAP 122mgをDMF 5mlに溶解し、CDI 681mgを加えてアルゴン気流中で攪拌した。mPEG-NH<sub>2</sub> (平均分子量5,000、日本油脂(株)社製) 1.0gをDMF 2mlに溶解し、前述した反応混合物286μlを加え、室温で反応した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、白色沈殿を回収して減圧乾燥し、残渣を950mg得た(収率95%)。続いて残渣をTSKgelODS-120Tカラム(30mm×250mm、東ソー)を用いて精製し、白色粉末を300mg得た(収率31.6%)。

次に、この白色粉末300mgを塩化メチレンに溶解し、DSC 15.4mg、DMAP 7.3mgを加え、アルゴン気流中室温で攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、

生成した白色沈殿を減圧乾燥した。塩化メチレン1mlを加えて溶解し、4-アミノブチルアルデヒドジエチルアセタール (4-aminobutylaldehyde diethylaeta) 3.5  $\mu$ lを加え、室温で攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、残渣を250mg得た（収率83.3%）。

残渣100mgを10%TFAを含む塩化メチレンに溶解し、0°Cで1時間静置後、ジエチルエーテルに滴下して白色沈殿を減圧乾燥し、40mgの目的物を得た（収率40.0%）。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

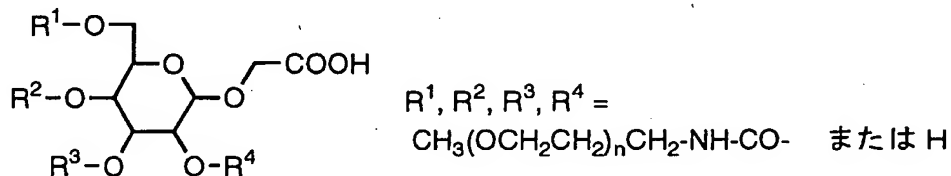
TSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

保持時間：10.6分

#### 実施例21 3～4本鎖分岐型ポリエチレングリコール糖誘導体の合成

略号：5SUG(3UA)、5SUG(4UA)

構造：



（式中、化合物5SUG(3UA)においては $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ のうち3つが $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ であり、残りの1つが水素原子である。化合物5SUG(4UA)においては $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ の全てが $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-NH-CO-}$ である）

5.18 gの $\alpha$ -D-グルコースペンタアセテートをDMF 80 mlに溶解し、2.37 gのヒドラジンアセテートを添加し、室温で1.5時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出後、酢酸エチル層を水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶液を減圧濃縮して、 $\alpha$ -D-グルコピラノース-2, 3, 4, 6-テトラアセテート ( $\alpha$ -D-Glucopyranose-2, 3, 4, 6-tetraacetate) を4.0 g得た（収率87%）。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)>

(ppm): 2.02 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.14 (m, 1H), 4.27 (m, 2H), 4.91 (m, 1H), 5.09 (t, 1H, J=9.7 Hz), 5.47 (d, 1H, J=3.7 Hz), 5.55 (t, 1H, J=9.8 Hz)

850 mgの上記化合物を塩化メチレン15 mlに溶解し、0°Cにて4.8 mlのトリクロロアセトニトリル、365 mlのDBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene)を添加した。溶液を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムで精製し、 $\alpha$ -D-グルコピラノース-2, 3, 4, 6-テトラアセテート1-(2, 2, 2-トリクロロエタニミデート) ( $\alpha$ -D-glucopyranose-2, 3, 4, 6-tetraacetate-1-(2, 2, 2-Trichloroethanimidate)) を635 mg得た (収率53%)

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)>

(ppm): 2.02 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 4.13 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 5.19 (t, 1H, J=9.8 Hz), 5.57 (t, 1H, J=9.9 Hz), 6.56 (d, 1H, J=3.7 Hz), 8.71 (s, 1H)

693 mgの上記化合物と109  $\mu$ lのグリコール酸メチルを塩化メチレンに溶解し、アルゴン雰囲気下、室温で攪拌した。反応液を冷却し、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルと脱水塩化メチレンの混合溶液(2:1)163  $\mu$ lを添加し、一昼夜攪拌した。77  $\mu$ lのトリエチルアミンを添加し、セライトで濾過した。溶液を減圧下濃縮した後、シリカゲルカラムで精製し、[(2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-グルコピラノシル)オキシ]酢酸メチルエステル[(2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl) oxy] acetic acid methyl esterを162 mg得た (収率27%)。

<<sup>1</sup>H-NMR分析 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)>

(ppm): 2.01 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 3.70 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.14 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 4.67 (d, 1H, J=7.8 Hz), 5.05 (m, 1H), 5.09 (t, 1H, J=10.8 Hz), 5.25 (t, 1H, J=9.5 Hz)

162 mgの上記化合物をメタノール1 mlに溶解し、アンバーリストを添加した。

ナトリウムメトキシドのメタノール溶液(28%) 9.4  $\mu$ lを添加し、室温で攪拌した。反応液をセライトで濾過し、濾液を減圧下濃縮して[( $\beta$ -D-グルコピラノシル)オキシ]酢酸メチルエステル[( $\beta$ -D-glucopyranosyl) oxy] acetic acid methyl esterを80 mg得た(収率82%)。

< $^1$ H-NMR分析 ( $D_2O$ , 300 MHz)>

(ppm): 3.39 (s, 2H), 3.40 (m, 2H), 3.69 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.86 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 4.26 (m, 1H) 4.44 (m, 1H)

2 mgの上記化合物をDMF 100  $\mu$ lに溶解し、7  $\mu$ lのトリエチルアミン、少量のCuClを添加した。240 mgのmPEG-NCOを添加し、攪拌した。溶液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を回収し、減圧乾燥した。得られた白色固体200 mgを1 mol/L 炭酸カリウム水溶液に溶解し、室温で4時間攪拌した。反応液にクロロホルムおよび0.1mol/L塩酸を添加し、クロロホルム層を抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧乾燥し、白色固体195 mgを得た。20mlのDEAE Sepharose F.F.カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、下記に示す化合物を得た。

化合物5SUG(3UA)の収量は6mg(収率5.0%)でありゲル濾過HPLCでの保持時間は10.8分であった。化合物5SUG(4UA)の収量は12mg(収率7.6%)でありゲル濾過HPLCでの保持時間は10.4分であった。なおゲル濾過HPLCはTSKgelG2000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例1と同様の条件で測定した。

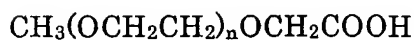
< $^1$ H-NMR分析 ( $CDCl_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm) : 3.38 (s, 9Hまたは12H), 3.64 (t, 12nHまたは16nH), 4.1~5.6 (m, 7H)

実施例22 10kDa直鎖型ポリエチレングリコール誘導体の合成

略号 : 10SCM

構造 :



S.ZalipskyとG.Baranyの方法 [ジャーナル オブ バイオアクティブ アンド コンパチブル ポリマーズ (Journal of Bioactive and compatible polymers) 5巻、227頁 (1990年) ] に準じて以下の方法で製造した。

mPEG[モノメトキシポリエチレングリコール、平均分子量10,000、日本油脂(株)社製、SUNBRIGHT VFM-3010M] 10gを乾燥トルエン50mlに溶解し、tert-ブトキシカリウム1.12gを加え蒸留し、初めの留分30mlを除去した。アルゴン気流中、50°Cに冷却後、 $\alpha$ -プロモ酢酸エチル1.1mlを加え、一昼夜攪拌を続けた。反応混合物を500mlのジエチルエーテルに滴下し、生成した沈殿を濾過により回収し、減圧下乾燥した。続いて、得られた乾燥粉末9.2gを1mol/L水酸化ナトリウム水溶液150mlに溶解し、室温で1時間攪拌した。1mol/L塩酸160mlを加え、クロロホルム500mlで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、10mlまで減圧濃縮した後、300mlのジエチルエーテル中に滴下し、生成した沈殿を減圧乾燥して目的化合物を白色粉末として7.5g得た (収率75%)。

< $^1\text{H}$ -NMR分析 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) >

$\delta$  (ppm): 3.64(s, 4nH), 3.38(s, 3H), 4.15(s, 2H)

実施例23 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号: 5CHTO(2UU)-rhIFN- $\beta$

塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で調製した1.3mg/mlの参考例1で得られる未修飾rhIFN- $\beta$  1.2mlに、実施例1で取得した化合物15mg (蛋白質1モル当たり20モル) を加え、一昼夜4°Cで反応を行った。次に、反応液をSephacryl S300カラム24ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) を用いてゲル濾過した。溶離液にはエチレングリコールおよび0.1mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液を使用した。目的物を含む画分14.5mlを回収し、水14.5mlを加えて希釈し、CM-Sepharose F.F.カラム1.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) で精製した。ゲル濾過で得られた画分を同カラムに通塔し、3mlの同緩衝液で洗浄した後、1mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.24mg/mlの目的物を含む画

分1.4mlを回収した（収率21.5%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下でSDS-PAGEを行い、1～5分子結合体のバンドを確認した。

<電気泳動条件>

ゲル：PAGEL SPG 520L（アトー社製）

染色：FAST STAIN™

分子量マーカー：Low Molecular Weight Standard（バイオラッド社製）

<ゲル濾過HPLC分析>

移動相：150mmol/L塩化ナトリウム、20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）

流量：0.5ml/分

検出：UV280nm

分離カラム：TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>（7.8×300mm×2本連結）（東ソー社製）

保持時間：40.3分（1～4分子結合体）

実施例24 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号：5CHTC(2AA)-rhIFN- $\beta$

実施例2の化合物100mg（0.01mmol）を、1.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS5.7mg（0.05mmol）、DCC10.3mg（0.05mmol）を加え、アルゴン気流中0℃で30分間攪拌した。その後3時間室温で攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥して実施例2の化合物のNHSエステルを65.0mg得た（収率65.0%）。

塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で調製した参考例1で得られる未修飾rhIFN- $\beta$ 溶液1.28ml（1.067mg/ml）へ、上記NHSエステルを17mg（蛋白質1モルに対して25モル）加え、4℃で一昼夜反応した。次に、反応液をSephacryl S300カラム24ml（Amersham-Pharmacia Biotech社製）を用いてゲル濾過した。溶離液にはエチレングリコールおよび0.1mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸

緩衝液を使用した。目的物を含む画分24mlを回収し、水24mlを加えて希釈し、CM-Sepharose F. F.カラム1.5ml (Amasham-Pharmacia Biotech社製) で精製した。ゲル濾過で得られた画分を同カラムに通塔し、3mlの同緩衝液で洗浄した後、1mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.49mg/mlの目的物を含む画分1.5mlを回収した (収率44.5%) 。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラムを2本用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：43.9分 (1分子結合体)

41.0分 (2分子結合体)

実施例25 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号：5CHTO(2EA)-rhIFN- $\beta$

実施例3の化合物20mgを塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS 1.15mgおよびDCC 2.06mgを加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下して沈殿させた。沈殿を減圧下乾燥して実施例3の化合物のNHSエステルを14.5mg得た (収率72.5%) 。

塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で調製した参考例1で得られる未修飾rhIFN- $\beta$  溶液0.78ml (0.937mg/ml) に、上記NHSエステルを9.1mg (蛋白質1モルに対して25モル) 加え、4°Cで一昼夜反応した。次に、反応液をSephacryl S300カラム24ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) を用いてゲル濾過した。溶離液にはエチレングリコールおよび0.1mol/L塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液を使用した。目的物を含む画分8.5mlを回収し、水8.5mlを加えて希釈し、CM-Sepharose F. F.カラム1.5ml (Amasham-Pharmacia Biotech社製) で精製した。ゲル濾過で得られた画分を同カラムに通塔し、3mlの同緩衝液で洗浄した後、1mol/L



塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.067mg/mlの目的物を含む画分0.5mlを回収した（収率4.5%）。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：35.9分（1～3分子結合体）

実施例26 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhIFN- $\beta$

実施例4の化合物487mg (48.7 $\mu$ mol) を塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中 NHS16.8mg (146.0 $\mu$ mol) およびDCC 30.1mg (145.9 $\mu$ mol) を加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下して沈殿させた。沈殿を減圧下乾燥して実施例4の化合物のNHSエステルを260.0mg得た（収率53.4%）。

続いて、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.8）で調製した参考例1で得られる未修飾rhIFN- $\beta$ 溶液1.2ml (1.22mg/ml) に上記NHSエステルを14.6mg（蛋白質1モルに対して20モル）加え、4℃で一昼夜反応した。次に、反応液をゲル濾過カラムSephadex-G25（NAP-10、Amersham-Pharmacia Biotech社製）を用いてエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH6.0）に緩衝液交換した。ゲル濾過で得られた画分をCM Sepharose F. F.カラム1.5ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）に通塔し、3mlの同緩衝液で洗浄した後、0.2～1.0mol/L塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出し、分画した。0.194mg/mlの目的物を含む画分3.75mlを回収した（収率49.7%）。

#### <電気泳動>

実施例23と同様に分析し、ポリエチレングリコールが1～2分子結合した修飾体

を確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.9分（1分子結合体）

40.2分（2分子結合体）

実施例27 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロナーβの調製

略号：5ORN(2UA)-rhIFN-β

実施例13の化合物100mg（10μmol）を塩化メチレン1mlに溶解し、アルゴン気流中、NHS 3.5mg（30μmol）とDCC 6.2mg（30μmol）を加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。反応液を濾過し、不溶物を除去した後、濾液をジエチルエーテル中に滴下して沈殿させた。沈殿を減圧乾燥して実施例13の化合物のNHSエステルを65mg得た（収率65%）。

次に、エチレングリコールおよび1mol/L塩化ナトリウム水溶液を含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した参考例1で得られるrhIFN-β溶液1.2ml（1.0mg/ml）へ、上記で活性化した修飾剤を12mg（蛋白質1モルに対して20モル）加え、4℃で一昼夜反応した。

反応液をCM-Sepharose FFカラム1.5ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で実施例23と同様に精製し、0.113mg/mlの目的物を4.4ml得た（収率41.4%）。

<電気泳動>

実施例23と同様にSDS-PAGEにより分析し、1～4分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：43.1分（1分子結合体）

40.0分（2分子結合体）

38.5分（3分子結合体）

実施例28 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロナー $\beta$ の調製

略号：5ORN(2RaA)-rhIFN- $\beta$

実施例14の化合物100mg (10 $\mu$ mol) を1mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 5.7mg (50 $\mu$ mol)、DCC 10.3mg (50 $\mu$ mol) を加え、アルゴン気流中氷冷下30分、続いて室温で2時間攪拌した。反応液を濾過し不溶物を除去した後、濾液をジエチルエーテル中に滴下した。沈殿を減圧乾燥して実施例14の化合物のNHSエステル58mg (収率58%) を得た。

次に、エチレングリコールおよび1mol/L塩化ナトリウム水溶液を含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製したrhIFN- $\beta$  溶液1.2ml (1.2mg/ml) へ、上記のNHSエステルを14.6mg (蛋白質1モルに対して20モル) 加え、反応した。反応液をCM-Sepharose FFカラム1.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、0.12mg/mlの目的物を3.5ml得た (収率35.0%) 。

<電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：43.5分 (1分子結合体)

41.1分 (2分子結合体)

実施例29 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロナー $\beta$ の調製

略号：5DPA(2UA)-rhIFN- $\beta$

実施例15の化合物100mg (10 $\mu$ mol) を1mlの塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中NHS 57.5mg (50 $\mu$ mol) およびDCC 10.3mg (50 $\mu$ mol) を加え0°Cで30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下し

た。沈殿を減圧下乾燥して、実施例15の化合物のNHSエステルを71mg（収率71％）得た。

次に、エチレングリコールおよび1mol/L塩化ナトリウム水溶液を含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製したrhIFN- $\beta$ 溶液1.2ml（1.1mg/ml）へ、上記のNHSエステルを13.2mg（蛋白質1モルに対して20モル）加え、反応した。反応液をCM-Sepharose FFカラム1.5ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.12mg/mlの目的物を3.5ml得た（収率31.8％）。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラムを2本用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：43.0分（1分子結合体）

48.2分（2分子結合体）

#### 実施例30 6kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の調製

略号：PEG<sub>2</sub>Mal-rhIFN- $\beta$

塩化ナトリウム、尿素、マンニトールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した2.44mg/mlのrhIFN- $\beta$ 溶液0.62mlに、実施例12で得た化合物（平均分子量12,000）2.7mg（蛋白質1モルあたり3モル）を加え、反応した。次に、反応液0.38mlをSephacryl S-300カラム（カラムサイズ20ml、Amersham-Pharmacia Biotech社製）でゲル濾過精製し、0.17mg/mlの目的物を含む画分1.5mlを回収した（収率16.9％）。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体を確認した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして測定した。

保持時間：44.4分

実施例31 20kDa直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の調製

略号：20Mal-rhIFN- $\beta$

塩化ナトリウム、尿素、マンニトールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した1.72mg/mlのrhIFN- $\beta$ 溶液0.42mlに、mPEG-maleimide(平均分子量20,000、Shearwater Polymers, Inc.製) 2.1mg(蛋白質1モルあたり3モル)を加え、反応した。次に、反応液0.38mlを、Sephacryl S-400カラム(カラムサイズ20ml、Amersham-Pharmacia Biotech社製)でゲル濾過精製し、0.10mg/mlの目的物を含む画分1.5mlを回収した(収率22.7%)。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様に分析した。

保持時間：40.0分

実施例32 5kDa直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の調製

略号：5Mal-rhIFN- $\beta$

塩化ナトリウム、尿素、マンニトールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した1.7mg/mlのrhIFN- $\beta$ 溶液0.42mlに、mPEG-maleimide(平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc.製) 0.55mg(蛋白質1モルあたり3モル)を加え、反応した。次に、反応液0.38mlをSephacryl S-200カラム(カラムサイズ20ml、Amersham-Pharmacia Biotech社製)でゲル濾過精製し、会合体および未反応のrhIFN- $\beta$ を除いた目的画分4.5mlを回収した。さらに、CM-Sepharose FFカラム(カラムサイズ1ml、Amersham-Pharmacia Biotech社製)で精製し、0.082mg/mlの目的物を含む画分1mlを回収した(収率11.3%)。

<電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして測定した。

保持時間：46.2分

実施例33 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロナーβの調製

略号：5TRC(3UA)-rhIFN-β

実施例16の化合物5mg (0.33 μmol) に塩化メチレンで調製した1.5mg/mlのNHS溶液50 μl (0.66 μmol)、1.4mg/mlのDCC溶液100 μl (0.66 μmol) を加え、アルゴン気流中、氷冷下30分間室温で2時間攪拌した。ジエチルエーテルを加えて生成した沈殿を減圧下乾燥してNHSエステルを3.5mg (収率70%) 得た。

次に、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した参考例1で得られるrhIFN-β溶液150 μl (0.9mg/ml) へ、上記のNHSエステルを33.4mg (蛋白質1モルに対して34モル) 加え、4℃で一昼夜静置して反応した。反応液をゲル濾過カラムSephadex G-25 (Amersham-Pharmacia Biotech社) でエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6.0) に緩衝液交換し、CM Sepharose F.F.カラム0.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、0.091mg/mlの目的物を0.40ml得た (収率27.0%) 。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様に分析した。

保持時間：42.0分 (1分子結合体)

44.1分 (2分子結合体)

実施例34 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインター

## フェロニーβの調製

略号：5SKA(3UA)-rhIFN-β

実施例7の化合物5SKA(3UA)16mg(1.1μmol)を100μlの塩化メチレンに溶解し、272μgのDCCと152μgのNHSを加え、氷冷下1時間、室温で1時間攪拌した。ジエチルエーテルに滴下して生成した白色沈殿を減圧乾燥し、上記化合物のNHSエステルを14.5mg得た(収率91%)。

次に、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液で調製した参考例1で得られるrhIFN-β溶液100μl(1.2mg/ml)へ、上記で得られたNHSエステルを8.6mg(蛋白質1モルに対して100モル)加え、4℃で一昼夜静置して反応した。反応液をゲル濾過カラムSephadex G-25(Amersham-Pharmacia Biotech社)でエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6.0)に緩衝液交換し、CM Sepharose F.F.カラム0.6ml(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、47μg/mlの目的物を80μl得た(収率3.3%)。

## &lt;電気泳動&gt;

実施例23と同様に2-メルカプトエタノール存在下でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

## &lt;ゲル濾過HPLC&gt;

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラムを2本用い、実施例23と同様の条件で分析した。  
保持時間：41.7分(1分子結合体)

## 実施例35 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロニーβの調製

略号：5PET(3UU)-rhIFN-β

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.8)で調製した参考例1で得られるrhIFN-β溶液0.5ml(1.2mg/ml)へ、実施例19で得られた化合物5PET(3UU)を4.5mg(蛋白質1モルに対して10モル)加え、4℃で一昼夜反応した。反応液0.5mlをSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)でエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6)に緩衝液交換し

た。これをCM-Sepharose F.F.カラム0.8ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、0.67mg/mlの目的物を含む溶液0.36mlを得た (収率40%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間 : 41.1分 (1分子結合体)

38.2分 (2分子結合体)

実施例36 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロンの製造

略号 : 5PET(3UA)-rhIFN- $\beta$

実施例17の化合物5PET(3UA)254mg(0.02mmol)を、2.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 5.9mg(0.05mmol)、DCC 10.5mg(0.05mmol)を加え、アルゴン気流中0℃で1時間、室温で2時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥して実施例17の化合物のNHSエステルを132.8mg得た(収率52.3%)。

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.8)で調製した参考例1で得られるrhIFN- $\beta$  溶液1.0ml(1.16mg/ml)へ、実施例17の化合物のNHSエステルを13mg(蛋白質1モルに対して15モル)加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) でエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6) に緩衝液交換した。これをCM-Sepharose F.F.カラム1.4ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、0.14mg/mlの目的物を含む溶液1.0mlを得た (収率12%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>



TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：43.8分（1分子結合体）

41.2分（2分子結合体）

実施例37 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール（従来型試薬）修飾組換え型ヒトインターフェロナー $\beta$ の調製

略号：PEG<sub>2</sub>Lys-rhIFN- $\beta$

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.8）で調製した参考例1で得られるrhIFN- $\beta$ 溶液1.3ml（0.97mg/ml）へ、PEG<sub>2</sub>Lys（平均分子量10,000、Shearwater polymers, Inc.製）を8.3mg（蛋白質1モルに対して12.5モル）加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）でエチレングリコールを含む20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH6）に緩衝液交換した。これをCM-Sepharose F.F.カラム1.4ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.36mg/mlの目的物を含む溶液2.7mlを得た（収率76.7%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：45.3分（1分子結合体）

41.5分（2分子結合体）

実施例38 20kDa直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロナー $\beta$ の調製

略号：20SPA-rhIFN- $\beta$

20mmol/Lりん酸緩衝液（pH 7.5）で調製した1.0mg/mlのrhIFN- $\beta$  1.3mlに、mPEG-プロピオン酸のNHSエステル（平均分子量20,000、Shearwater Polymers, Inc.製）

7.9mg (蛋白質1モル当たり6モル)を加え、一昼夜4°Cで静置して反応を行った。次に、反応液をSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社製) を用いて20mmol/Lりん酸緩衝液(pH 6.0)に緩衝液交換し、0.52mg/mlの反応液2.1mlを得た。この内、1.9mlをCM-Sepharose FFカラム2ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) で精製し、0.18mg/mlの目的物を含む画分4.9mlを回収した (収率66.5%)。

#### <電気泳動>

実施例23の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間: 40.1分 (1分子結合体)

35.6分 (2分子結合体)

33.2分 (3分子結合体)

実施例39 5kDa直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の調製

略号: 5SPA-rhIFN- $\beta$

20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 7.5) で調製した0.8mg/mlのrhIFN- $\beta$  1.3mlに、mPEG-プロピオン酸のNHSエステル (平均分子量5,000、Shearwater Polymers, Inc.製) 1.6mg (蛋白質1モル当たり6モル)を加え、一昼夜4°Cで静置して反応を行なった。次に、反応液をSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社製) を用いて20mmol/Lりん酸緩衝液(pH 6.0)に緩衝液交換し、0.40mg/mlの反応液2.1mlを得た。この内、1.9mlをCM-Sepharose FFカラム1.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社製) で精製し、0.15mg/mlの目的物を含む画分4.2mlを回収した (収率60.1%)。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

#### <ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様に分析した。

保持時間：46.2分（1分子結合体）

43.6分（2分子結合体）

42.0分（3分子結合体）

実施例40 10kDa 直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号：10SCM-rhIFN- $\beta$

実施例22の化合物1.0g (0.1mmol) を塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS21.8mg (0.19mmol) およびDCC39.0mg (0.19mmol) を加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下して沈殿させた。沈殿を減圧下乾燥して実施例22の化合物のNHSエステルを506.8mg得た（収率50.7%）。

続いて、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.8）で調製した参考例1で得られるrhIFN- $\beta$ 溶液3.0ml (0.81mg/ml) に上記のNHSエステルを16.2mg加え、4°Cで一昼夜反応した。次に、反応液をゲル濾過カラムSephadex-G25（Amersham-Pharmacia Biotech社製）を用いて脱塩した。ゲル濾過で得られた画分4.5mlをCM Sepharose F. F.カラム2.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.22mg/mlの目的物を含む画分4.0mlを回収した（収率36.2%）。

<電気泳動>

実施例23と同様に分析し、ポリエチレングリコールが1～3分子結合した修飾体を確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：44.2分（1分子結合体）

41.0分（2分子結合体）

実施例41 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾天然型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号：5CHTM(2EA)-天然型hIFN- $\beta$

天然型hIFN- $\beta$  10 $\mu$ g (STRATHMANN BIOTECH GMBH) を等張りん酸緩衝液200 $\mu$ lに溶解し、実施例26で得られた5CHTM(2EA)のNHSエステルを1.5mg (蛋白質1モルに対して300モル) 加え、20°Cで一昼夜反応した。反応液をゲル濾過カラム Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia Biotech社) でエチレングリコールを含む 20mmol/Lりん酸緩衝液に緩衝液交換した。次いで、CM-Sepharose F. F.カラム0.5ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、0.021mg/mlの目的物を含む溶液0.19ml 得た (収率39.9%)。

実施例42 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の製造

略号：5CHTM(2EA)-<sup>17</sup>Ser rhIFN- $\beta$

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.6) で調製した<sup>17</sup>Ser rhIFN- $\beta$  (Chiron社製) の溶液0.1ml (1.0mg/ml) へ、実施例26と同様にして得られた実施例4の化合物 (5CHTM(2EA)) のNHSエステル 1.3mg (蛋白質1モル当たり25モル) を加え、4°Cで一昼夜反応した。次に、反応液をゲル濾過カラム Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia Biotech社) を用いてエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6.0) に緩衝液交換した。ゲル濾過で得られた画分をCM Sepharose F. F.カラム0.25ml (Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製し、39 $\mu$ gの目的物を含む画分0.75mlを回収した (収率39%)。

<電気泳動>

実施例23と同様に分析し、ポリエチレングリコールが1~3分子結合した修飾体を確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：41.3分 (1~3分子結合体)

実施例43 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインター

フェロン- $\beta$ の製造略号：5PET(3UA)- $^{17}$ Ser rhIFN- $\beta$ 

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で調製した $^{17}$ Ser rhIFN- $\beta$  (Chiron社製)の溶液0.05ml(2.1mg/ml)へ、実施例36で得られる実施例17の化合物(5PET(3UA))のNHSエステル1.6mg(蛋白質1モルに対して20モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)を用いてエチレングリコールを含む20mmol/Lりん酸緩衝液(pH6)に緩衝液交換した。ゲル濾過で得られた画分をCM-Sepharose F.F.カラム0.5ml(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、27.8 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液0.30mlを得た(収率7.9%)。

## &lt;電気泳動&gt;

2-メルカプトエタノール存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例44 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\alpha$ の製造略号：5CHTC(2AA)-rhIFN- $\alpha$ 

等張りん酸緩衝液(pH7.5)で調製した1.0mg/mlのrhIFN- $\alpha$  [免疫生物研 (IBL)] 0.1mlに、実施例24で得られる5CHTC(2AA)のNHSエステル1.5mg(蛋白質1モル当たり30モル)を加え、一昼夜4℃で反応を行った。次に、反応液80 $\mu$ lをSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech製)で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これを、SP-Sepharose F. F.カラム1.0ml(Amersham-Pharmacia Biotech製)で精製し、80 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液0.5mlを得た(収率40.0%)。

## &lt;電気泳動&gt;

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

## &lt;ゲル濾過HPLC分析&gt;

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：43.1分（1分子結合体）

40.5分（2分子結合体）

実施例45 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\alpha$ の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhIFN- $\alpha$

等張りん酸緩衝液(pH7.5)で調製した0.95mg/mlのrhIFN- $\alpha$  [免疫生物研 (IBL)] 0.1mlに、実施例26で得られる5CHTM(2EA)のNHSエステル1.5mg (蛋白質1モル当たり30モル)を加え、一昼夜4°Cで反応を行った。次に、反応液0.1mlをSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech製)で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これを、SP-Sepharose F. F.カラム1.0ml (Amersham-Pharmacia Biotech製)で精製し、50 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液0.6mlを得た (収率31.6%)。

<電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例23と同様の条件で分析した。

保持時間：42.9分（1分子結合体）

41.2分（2分子結合体）

実施例46 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン $\alpha$ の製造

略号：5PET(3UA)-rhIFN- $\alpha$

等張りん酸緩衝液(pH7.5)で調製した1.0mg/mlのrhIFN- $\alpha$  溶液 [免疫生物研 (IBL)] 0.1mlへ、実施例36で得られる実施例17の化合物 (5PET(3UA)) のNHSエステル1.6mg(蛋白質1モルに対して20モル)を加え、4°Cで一昼夜反応した。反

応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sephärose F.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.53mg/mlの目的物を含む溶液65 $\mu$ lを得た（収率34%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.6分（1分子結合体）

40.3分（2分子結合体）

実施例47 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\gamma$ の製造

略号：5CHTC(2AA)-rhIFN- $\gamma$

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.8）で調製した参考例2で得られるrhIFN- $\gamma$ （0.10mg/ml）0.1mlに、実施例24で得られる5CHTC(2AA)のNHSエステル1.0mg（蛋白質1モル当たり200モル）を加え、4℃で一昼夜反応した。

<電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

実施例48 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\gamma$ の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhIFN- $\gamma$

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.8）で調製した参考例2で得られるrhIFN- $\gamma$ （0.8mg/ml）0.8mlに、実施例26

で得られる5CHTM(2EA)のNHSエステル10.1mg(蛋白質1モル当たり30モル)を加え、4°Cで一昼夜反応した。

<電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例49 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号: 5CHTO(2UU)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.2mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体100 $\mu$ lに実施例1の化合物1.7mg(蛋白質1モルに対して10モル)を添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液(pH4.5)で希釈し、そのうち900 $\mu$ lを同緩衝液で平衡化したSephadex G-25カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech製)に通塔し、1.3mlを回収した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml(Amersham-Pharmacia Biotech製)で精製し、402 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液360 $\mu$ lを得た(収率50.3%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~4分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間: 42.8分(1分子結合体)

41.3分(2分子結合体)

実施例50 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号: 5CHTC(2AA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.9mg/mlに調製した参考例3で得られる



rhG-CSF誘導体100 $\mu$ lに5.1mg（蛋白質1モル当たり25モル）の実施例24で得られる5CHTC(2AA)のNHSエステルを添加し、4℃で一昼夜反応させた。反応液を希釈し、そのうち900 $\mu$ lをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech製）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.3mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech製）で精製し、179 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液500 $\mu$ lを得た（収率25.8%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.8分（1分子結合体）

40.3分（2分子結合体）

実施例51 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5CHTO(2EA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で3.8mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体100 $\mu$ lに6.0mg（蛋白質1モル当たり25モル）の実施例25で得られる5CHTO(2EA)のNHSエステルを添加し、4℃で一昼夜反応させた。反応液を希釈し、そのうち900 $\mu$ lをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech製）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.3mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech製）で精製し、335 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液450 $\mu$ lを得た（収率44.2%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.6分（1分子結合体）

39.5分（2分子結合体）

実施例52 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhG-CSF誘導体

実施例4の化合物487mg(48.7 $\mu$ mol)を塩化メチレンに溶解し、アルゴン気流中、NHS16.8mg(146.0 $\mu$ mol)、DCC30.1mg(145.9 $\mu$ mol)を加え、氷冷下30分間、続いて室温で2時間攪拌した。不溶物を濾過し、濾液をジエチルエーテルに滴下した。沈殿を回収し、減圧乾燥して化合物4のNHSエステルを260.0mg得た（収率53.4%）。

等張りん酸緩衝液（pH7.4）で調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体1.25ml（4.0mg/ml）に上記のNHSエステルを26.6mg（蛋白質1モル当たり25モル）加え、4℃で一昼夜反応した。反応液1.0mlをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.5mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F.カラム5.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、1.86mg/mlの目的物を含む溶液0.7mlを取得した（収率32.5%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：48.7分（1分子結合体）

46.9分（2分子結合体）

実施例53 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5CHTM(2EU)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.3）で3.9mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体50 $\mu$ lに、実施例5の化合物1.0mg（蛋白質1モル当たり10モル）を添加し、4°Cで一昼夜反応させた。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

実施例54 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子誘導体の製造

略号：5CHTM(2EA2)-rhG-CSF誘導体

実施例10の化合物100mg（0.01mmol）を1.0mlの塩化メチレンに溶解し、NHS 3.5mg（0.03mmol）、DCC 6.2mg（0.03mmol）を加え、アルゴン気流中0°Cで90分間、その後室温で2時間攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥して実施例10の化合物のNHSエステルを56.5mg得た（収率56.5%）。

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で3.9mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体210 $\mu$ lに4.2mg（蛋白質1モル当たり10モル）の上記NHSエステルを添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム

（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、続いてSP Sepharose F.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.31mg/mlの目的物を含む画分を965 $\mu$ l得た（収率39.6%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SWXLカラムを用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.2分（1分子結合体）

40.6分（2分子結合体）

実施例55 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー形成刺激因子誘導体の調製

略号：5CHTM(2URa)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 7.5) で3.9mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体50 $\mu$ lに、実施例8で得られた化合物5.2mg (蛋白質1モル当たり50モル) を添加し、120mmol/Lの水素化ホウ素ナトリウム10 $\mu$ lを加え、室温で一昼夜反応させた。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

実施例56 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：5ORN(2UA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 7.5) で3.7mg/mlに調製したrhG-CSF誘導体50 $\mu$ lに、実施例27記載の方法で実施例13の化合物を活性化して得られる化合物2mg (蛋白質1モル当たり10モル) を添加し、4℃で一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化したSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech製) に通塔し、0.8mlを回収した。次いで、SP-Sepharose FFカラム0.7ml

(Amersham-Pharmacia Biotech製) で精製し、370 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液400 $\mu$ lを得た (収率25.9%) 。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.4分 (1分子結合体)

## 39.5分 (2分子結合体)

実施例57 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：5ORN(2RaA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 7.4) で3.8mg/mlに調製したrhG-CSF誘導体50 $\mu$ lに2.0mg (蛋白質1モル当たり10モル) の活性化PEG誘導体 (実施例14の化合物を実施例28記載の方法で活性化した化合物) を添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化したSephadex G-25カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech製) に通塔し、0.8mlを回収した。次いで、SP-Sepharose FFカラム0.7ml (Amersham-Pharmacia Biotech製) で精製し、71 $\mu$ g/mlの目的物を含む溶液420 $\mu$ lを得た (収率19.9%) 。

## &lt;電気泳動&gt;

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

## &lt;ゲル濾過HPLC分析&gt;

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.7分 (1分子結合体)

40.8分 (2分子結合体)

実施例58 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：5DPA(2UA)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH 7.4) で3.7mg/mlに調製したrhG-CSF誘導体50 $\mu$ lに2.0mg (蛋白質1モル当たり10モル) の活性化PEG誘導体 (実施例15の化合物を実施例29記載の方法で活性化した化合物) を添加し、4°Cで一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化したSephadex G-25カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech製) に通塔し、0.8mlを回収した。次いで、

SP-Sepharose FFカラム0.7ml (Amersham-Pharmacia Biotech製) で精製し、 $67\mu\text{g/ml}$ の目的物を含む溶液 $350\mu\text{l}$ を得た (収率16.0%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.4分 (1分子結合体)

39.5分 (2分子結合体)

実施例59 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：SSKA(3UA)-rhG-CSF誘導体

実施例7の化合物SSKA(3UA)16mg( $1.1\mu\text{mol}$ )を $100\mu\text{l}$ の塩化メチレンに溶解し、 $272\mu\text{g}$ のDCCと $152\mu\text{g}$ のNHSを加え、氷冷下1時間、室温で1時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下して生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例7の化合物SSKA(3UA)のNHSエステルを14.5mg得た (収率91%)。

50mmol/Lりん酸緩衝液 (pH7.5) で $3.7\text{mg/ml}$ に調製したrhG-CSF誘導体 $50\mu\text{l}$ に上記のNHSエステル3.6mg (蛋白質1モル当たり25モル)を加え、 $4^{\circ}\text{C}$ で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム (Amersham-Pharmacia Biotech社) で20mmol/L酢酸緩衝液 (pH4.5) に緩衝液交換し、0.7mlのSP Sepharose F.F.カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。目的画分を濃縮し、 $0.4\text{mg/ml}$ の目的物を含む溶液 $165\mu\text{l}$ を取得した (収率36%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.3分（1分子結合体）

40.2分（2分子結合体）

実施例60 5kDa 4本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：5QNA(4UA)-rhG-CSF誘導体

実施例6の化合物5QNA(4UA)69mg(3.5  $\mu$ mol)を500  $\mu$ lの塩化メチレンに溶解し、1.8mgのDSCと0.56mgのDMAPを加え、室温で6時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例6の化合物5QNA(4UA)のNHSエステルを44mg得た（収率63%）。

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH8）で3.8mg/mlに調製した参考例3のrhG-CSF誘導体50  $\mu$ lに上記のNHSエステル5.1mg（蛋白質1モル当たり25モル）を加え、4℃で一昼夜反応させた。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：40.8分（1分子結合体）

実施例61 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5PET(3UU)-rhG-CSF誘導体

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.1mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体0.5mlに、実施例19で得られた化合物12.2mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech社)で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム1.5ml（Amersham-Pharmacia Biotech

社)で精製し、1.2mg/mlの目的物を含む溶液0.75mlを得た(収率58.6%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間: 40.5分(1分子結合体)

37.8分(2分子結合体)

実施例62 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号: 5PET(3UA)-rhG-CSF誘導体

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で4.0mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体0.05mlに、実施例36で得られる実施例17の化合物のNHSエステル1.6mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、0.34mg/mlの目的物を含む溶液0.30mlを得た(収率56.7%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間: 42.3分(1分子結合体)

39.5分(2分子結合体)

実施例63 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コ



## ロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5SUG(3UA)-rhG-CSF誘導体

実施例21で調製した化合物5SUG(3UA)100mg (6.7 $\mu$ mol) に2.3mgのNHSと4.1mgのDCCを加え、氷冷下1mlの塩化メチレンに溶解し、氷冷下1時間、室温で1.5時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例21の化合物5SUG(3UA)のNHSエステルを76.6mg得た（収率76.6%）。

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で3.9mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体0.1mlに、上記活性化した化合物（実施例21の化合物5SUG(3UA)のNHSエステル）10.7mg(蛋白質1モルに対して35モル)を加え、4°Cで一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.28mg/mlの目的物を含む溶液0.39mlを得た（収率27.8%）。

## &lt;電気泳動&gt;

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

## &lt;ゲル濾過HPLC分析&gt;

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：43.0分（1分子結合体）

40.4分（2分子結合体）

## 実施例64 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：5PET(3URa)-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で2.35mg/mlに調製したrhG-CSF誘導体0.6mlに、実施例20の化合物56.3mg(蛋白質1モルに対して50モル)および120mmol/Lに調製したソディウムシアノボロヒドリド（NaBH<sub>3</sub>CN）10 $\mu$ lを加え、4°Cで一昼夜反応した。反応液を塩酸で酸性にして反応を停止し、Sephadex G-25カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech社)で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換した。これをSP Sepharose F.F.カラム1.4ml(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、0.24mg/mlの目的物を含む溶液0.55mlを得た(収率8.5%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：41.2分(1分子結合体)

実施例65 10kDa直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の製造

略号：10SCM-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で4.0mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体2.5mlに21.3mg(蛋白質1モル当たり4モル)の実施例22の化合物のNHSエステル(実施例40で調製)を添加し、4℃で一昼夜反応させた。反応液を20mmol/L酢酸緩衝液(pH4.5)で平衡化したSephadex G-25カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech製)に通塔し、4.0mlを回収した。これをSP-Sepharose F.F.カラム10.0ml(Amersham-Pharmacia Biotech製)で精製し、2.0mg/mlの目的物を含む溶液860 $\mu$ lを得た(収率34.4%)。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラムを用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.0分(1分子結合体)

39.5分(2分子結合体)

実施例66 20kDa 直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：20SPA-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH 7.6）で4.0mg/mlに調製したrhG-CSF誘導体995mlに19.1g（蛋白質1モル当たり4.5モル）の活性化PEG誘導体（M-SPA-20,000、Shearwater Polymers, Inc.製、平均分子量20,000）を添加し、4℃で一昼夜反応させた。次いで、20mmol/L酢酸緩衝液（pH 4.5）で平衡化したSP-Sepharose FFカラム2000ml

（Amersham-Pharmacia Biotech製）に通塔し精製した。目的画分4000mlを濃縮し、11.2mg/mlの目的物を含む溶液320mlを得た（収率90.4%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G-4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：38.2分（1分子結合体）

34.4分（2分子結合体）

32.2分（3分子結合体）

実施例67 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の調製

略号：PEG<sub>2</sub>Lys-rhG-CSF誘導体

50mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で4.0mg/mlに調製した参考例3で得られるrhG-CSF誘導体0.5mlに、PEG<sub>2</sub>Lys（平均分子量10,000、Shearwater Polymers, Inc.製）を10.6mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム2.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、1.05mg/mlの目的物を含む溶液0.5mlを得た（収率26.3%）。

## &lt;電気泳動&gt;

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

## &lt;ゲル濾過HPLC分析&gt;

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：44.3分（1分子結合体）

41.7分（2分子結合体）

実施例68 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の製造

略号：5CHTM(2EA)-rhG-CSF

等張りん酸緩衝液（pH7.4）で3.9mg/mlに調製した参考例4のrhG-CSF溶液0.9mlに、実施例26で得られる5CHTM(2EA)のNHSエステル28.0mg（蛋白質1モル当たり15当量）を添加し、4℃で一昼夜反応させた。

反応液0.8mlをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.5mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F. カラム5.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、1.3mg/mlの目的物を含む溶液1.0mlを得た（収率33.0%）。

## &lt;電気泳動&gt;

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

## &lt;ゲル濾過HPLC分析&gt;

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.8分（1分子結合体）

40.1分（2分子結合体）

実施例69 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の製造

略号：5CHTC(2AA)-rhG-CSF

等張りん酸緩衝液（pH7.4）で3.9mg/mlに調製した参考例4で得られるrhG-CSF溶液0.2mlに、実施例24で得られる5CHTC(2AA)のNHSエステル10.0mg（蛋白質1モル当たり25当量）を添加し、4℃で一昼夜反応させた。

反応液0.2mlをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.0mlを回収した。これをSP-Sepharose F. F. カラム1.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.7mg/mlの目的物を含む溶液0.3mlを得た（収率26.8%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：42.9分（1分子結合体）

40.4分（2分子結合体）

実施例70 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の調製

略号：5SKA(3UA)-rhG-CSF

実施例7の化合物5SKA(3UA)16mg(1.1 $\mu$ mol)を100 $\mu$ lの塩化メチレンに溶解し、272 $\mu$ gのDCCと152 $\mu$ gのNHSを加え、氷冷下1時間、室温で1時間攪拌した。反応液をジエチルエーテルに滴下し、生成した白色沈殿を減圧乾燥し、実施例7の化合物5SKA(3UA)のNHSエステルを14.5mg得た（収率91%）。

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で4.4mg/mlに調製した参考例4で得られたrhG-CSF 140 $\mu$ lに、上記活性化したNHSエステル12.2mg（蛋白質1モル当たり25モル）を加え、4℃で一昼夜反応させた。反応液をSephadex G-25カラム

（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、1.8mlのSP Sepharose F.F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製した。

目的画分を濃縮し、1.1mg/mlの目的物を含む溶液110 $\mu$ lを取得した（収率19%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSK gel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：40~45分（1~3分子結合体）

実施例71 5kDa 直鎖型ポリエチレングリコール修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の調製

略号：PEG<sub>2</sub>Lys-rhG-CSF

等張りん酸緩衝液(pH7.4)で4.4mg/mlに調製した参考例4のrhG-CSF溶液0.5mlに、PEG<sub>2</sub>Lys(Shearwater Polymers, Inc.製)11.7mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム(Amersham-Pharmacia Biotech社)で20mmol/L酢酸緩衝液(pH4.5)に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム2.0ml(Amersham-Pharmacia Biotech社)で精製し、1.78mg/mlの目的物を含む溶液0.5mlを得た（収率40.5%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgelG4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：44.2分（1分子結合体）

41.8分（2分子結合体）

実施例72 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号：SCHTC(2AA)-bSOD

実施例2の化合物30mg (3 $\mu$ mol) を塩化メチレン1mlに溶解し、NHS1.7mg (0.015mmol) およびDCC3.1mg (0.015mmol) を加え、0°Cで30分間攪拌した。その後3時間室温で攪拌し、反応液をジエチルエーテルに滴下した。白色沈殿を減圧乾燥して実施例2の化合物のNHSエステルを21mg得た (収率70%)。

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 $\mu$ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 $\mu$ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

実施例73 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号: 5CHTO(2EA)-bSOD

実施例3の化合物20mgを実施例25と同様の条件で活性化し、実施例3の化合物のNHSエステルを13mg得た (収率65%)。

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 $\mu$ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 $\mu$ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

#### <電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~2分子結合体のバンドを確認した。

実施例74 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号: 5CHTO(2UU)-bSOD

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50 $\mu$ lに実施例1で得た化合物の水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10 $\mu$ l (蛋白質1モルあたり50モル) を

加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例75 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号：5CHTM(2EA)-bSOD

実施例4の化合物487mg (48.7  $\mu$ mol) を実施例26記載の方法と同様の条件で活性化し、実施例4の化合物のNHSエステルを260mg得た。(収率53.4%)

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 50  $\mu$ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液 (156mg/ml蒸留水) 10  $\mu$ l (蛋白質1モルあたり50モル) を加え、4°Cで一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1~3分子結合体のバンドを確認した。

実施例76 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの精製

略号：5CHTM(2EA)-bSOD (精製品)

実施例4の化合物360mg (36.0  $\mu$ mol) を実施例26記載の方法と同様の条件で活性化し、実施例4の化合物のNHSエステルを181.9mg得た (収率50.5%)。

ウシCu,Zn型SOD溶液 (2mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、和光純薬製) 2.2mlに上記の実施例4の化合物のNHSエステル33.9mg(蛋白質1モルあたり25モル)を加え、4°Cで一昼夜反応させた。次に、この反応液を4.3mlのSP-Sepharose F. F.カラム

(Amersham-Pharmacia Biotech社) で精製した。未修飾SODの含まれない目的画分を濃縮し3.73mg/mlの溶液を200  $\mu$ l得た (収率17.2%)。さらにCuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>水溶液を各々10mmol/Lになるように加えて活性を回復した。



## &lt;電気泳動&gt;

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

実施例77 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu, Zn型スーパーオキシドディスムターゼの調製

略号：5ORN(2UA)-bSOD

実施例13の化合物20mgを実施例27記載の方法と同様の条件で活性化し、実施例13の化合物のNHSエステルを16.0mg得た（収率80.0％）。

ウシCu, Zn型-SOD溶液（2.0mg/ml、pH 9ほう酸緩衝液、和光純薬製）50 $\mu$ lへ、上記の活性化したNHSエステルの水溶液（156mg/ml蒸留水）10 $\mu$ l（蛋白質1モルあたり50モル）を加え、4℃で一昼夜静置して反応した。

## &lt;電気泳動&gt;

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1～5分子結合体のバンドを確認した。なお、未修飾のSODは検出されなかった。

実施例78 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ウシCu, Zn型スーパーオキシドディスムターゼの調製

略号：5DPA(2UA)-bSOD

実施例15の化合物20mgを実施例29記載の方法と同様の条件で活性化し、実施例15の化合物のNHSエステルを12.0mg得た（収率60.0％）。

ウシCu, Zn型-SOD溶液（2.0mg/ml、pH 9ほう酸緩衝液、和光純薬製）50 $\mu$ lへ、上記のNHSエステルの水溶液（156mg/ml蒸留水）10 $\mu$ l（蛋白質1モルあたり50モル）を加え、4℃で一昼夜静置して反応した。

## &lt;電気泳動&gt;

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1～5分子結合体のバンドを確認した。なお、未修飾のSODは検出されなかった。

実施例79 10kDa 直鎖型ポリエチレングリコール修飾ウシCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号：10SCM-bSOD（精製品）

ウシCu,Zn型-SOD溶液（2.0mg/ml、50mmol/Lほう酸緩衝液（pH9.0）、和光純薬製）1.0mlに実施例22の化合物のNHSエステル（実施例40で調製）18.8mg（蛋白質1モルあたり15モル）を加え、4℃で一昼夜反応させた。

次に、この反応液を2.0mlのSP-Sepharose F. F.カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、未修飾bSODを含まない目的画分を濃縮し、5.9mg/mlの溶液を120 $\mu$ l得た（収率35.4%）。さらにCuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>水溶液を各々10mmol/Lになるように加えて活性を回復した。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

実施例80 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ヒトCu,Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号：5CHTM(2EA)-hSOD

実施例4の化合物487mg（48.7 $\mu$ mol）を実施例26記載の方法と同様の条件で活性化し、実施例4の化合物のNHSエステルを260mg得た（収率53.4%）。

ヒトCu,Zn型SOD溶液（1.9mg/ml、pH9ほう酸緩衝液、CELLULAR PRODUCTS, INC.製）50 $\mu$ lに使用直前に調製した上記NHSエステルの水溶液（156mg/ml蒸留水）10 $\mu$ l（蛋白質1モルあたり50モル）を加え、4℃で一昼夜静置して反応させた。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1～3分子結合体のバンドを確認した。

実施例81 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ヒトCu、Zn型スーパーオキサイドディスムターゼの製造

略号：5CHTM(2UM)-hSOD（精製品）

実施例9の化合物3.13mg（蛋白質1モル当たり10モル）をヒトCu,Zn型SOD溶液 [2.63mg/ml、りん酸緩衝液（pH7.5）、CELLULAR PRODUCTS, INC.製] 0.6mlに加えて4℃で一昼夜静置して反応した。

次に、20mlのSephacryl S-300ゲル濾過カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製した。未反応のSODを含まない修飾体の画分を回収し、0.5mlまで濃縮した。この溶液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH3.5）に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、目的画分を濃縮した。さらに、CuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>水溶液を含む溶液各々10mmol/Lになるように加え、SODの活性を回復した。0.25mg/mlの目的物を含む溶液を180μl取得した（収率4.5%）。

<電気泳動>

実施例23と同様の条件でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

実施例82 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾ヒトCu,Zn型スーパーオキシドディスムターゼの製造

略号：5PET(3UM)-hSOD（精製品）

50mmol/Lりん酸緩衝液（pH7.5）で調製したCu, Zn型hSOD溶液（CELLULAR PRODUCTS, INC.製）0.5ml(1.34mg/ml)へ、実施例18で得られる化合物3.1mg(蛋白質1モルに対して10モル)加え、4℃で一昼夜反応した。反応液をSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH3.5）に緩衝液交換した。これをSP-Sepharose F.F.カラム0.7ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.33mg/mlの目的物を含む溶液0.62mlを得た（収率30.6%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1分子結合体のバンドを確認した。

<ゲル濾過HPLC分析>

TSKgel G4000SW<sub>XL</sub>カラム2本を用い、実施例23と同様にして分析した。

保持時間：41.1分（1分子結合体）

実施例83 5kDa 2本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾抗GD3キメラ抗体の製造

略号：5CHTM(2EA)-KM-871

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で2.6mg/mlに調製したKM-871水溶液0.5ml（特開平5-304989に従って調製）に、実施例4で得られた化合物のNHSエステルを1.0mg(蛋白質1モルに対して10モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液0.5mlをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換し、0.8mlを回収した。これをCM-SepharoseF.F.カラム1.2ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.59mg/mlの目的物を含む溶液0.38mlを得た（収率17.1%）。

<電気泳動>

実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、1～2分子結合体のバンドを確認した。

実施例84 5kDa 3本鎖分岐型ポリエチレングリコール修飾抗GD3キメラ抗体の製造

略号：5PET(3UA)-KM-871

20mmol/Lりん酸緩衝液(pH7.5)で1.1mg/mlに調製したKM-871溶液1.0ml（特開平5-304989に従って調製）に、実施例36で得られる5PET(3UA)のNHSエステル0.6mg(蛋白質1モルに対して5モル)を加え、4℃で一昼夜反応した。反応液1.0mlをSephadex G-25カラム（Amersham-Pharmacia Biotech社）で20mmol/L酢酸緩衝液（pH4.5）に緩衝液交換した。これをCM-SepharoseF.F.カラム1.0ml（Amersham-Pharmacia Biotech社）で精製し、0.52mg/mlの目的物を含む溶液430μlを得た（収率20.4%）。

<電気泳動>

2-メルカプトエタノール非存在下、実施例23と同様の方法でSDS-PAGEを行い、

1~2分子結合体のバンドを確認した。

#### 試験例1 化学修飾インターフェロン- $\beta$ の抗ウイルス活性

実施例23~実施例43で得られた化学修飾rhIFN- $\beta$ および化学修飾天然型hIFN- $\beta$ 、未修飾rhIFN- $\beta$ 、ならびに未修飾天然型hIFN- $\beta$ の抗ウイルス活性を下記のニュートラルレッド (NR) 取り込み法で調べた。

##### <NR取り込み法>

小長谷らの方法 [蛋白質核酸酵素 (別冊)、355頁 (1981年)] を参考に抗ウイルス活性を測定した。

すなわち、滅菌したトランスファープレートに5%ウシ胎児血清 (FBS) 添加イーグルMEM培地を添加した。次に、IFN国内標準品 [ $\alpha$  (ミドリ十字) および $\beta$  (東レ)] 溶液を各々50 $\mu$ lずつウェルに分注し、2倍ずつの段階希釈を行った。一方、所定の濃度に培地で調製した化学修飾IFNまたは未修飾IFN溶液も同様に50 $\mu$ lずつウェルに分注した。これらの溶液を、所定の細胞数のヒト羊膜由来の株化細胞 (FL細胞) を入れた96穴プレートにトランスし、数秒間攪拌した。37°Cで一昼夜、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、抗ウイルス状態を作った。

次に、培養液を除去した後、ウイルス溶液を添加し、37°Cで2日間、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養してウイルスを感染させた。IFNにより細胞の抗ウイルス状態が変化し、細胞変性が起こった。続いて、培養液を除去し、NR溶液を添加した。37°Cで1時間CO<sub>2</sub>インキュベーターに放置し、NR溶液を除去した。等張りりん酸緩衝液でウェルを洗浄し、抽出液 (0.01mol/L塩酸-30%エタノール) を添加し、2~3分間攪拌した。

NRにより生き残った細胞を染色し、抽出後、492nmでの吸光度を測定し、定量曲線をプロットした。定量曲線より算出した未修飾IFNの活性を100%としたときの化学修飾IFNの相対活性を算出した。

各IFN- $\beta$ の比活性を第1表、第2表および第3表に示す。

第1表 化学修飾組換え型ヒトインターフェロン  
- $\beta$ の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例番号	相 対 活 性 (%)
未修飾 rhIFN- $\beta$	—	100
5CHTO(2UU)-rhIFN- $\beta$	23	96
5CHTC(2AA)-rhIFN- $\beta$	24	122
5CHTO(2EA)-rhIFN- $\beta$	25	90
5CHTM(2EA)-rhIFN- $\beta$	26	116
5TRC(3UA)-rhIFN- $\beta$	33	58
5SKA(3UA)-rhIFN- $\beta$	34	93
5PET(3UA)-rhIFN- $\beta$	36	50
PEG <sub>2</sub> Mal-rhIFN- $\beta$	30	78
20SPA-rhIFN- $\beta$	38	>100
5SPA-rhIFN- $\beta$	39	>100
20Mal-rhIFN- $\beta$	31	60
5Mal-rhIFN- $\beta$	32	80
5ORN(2UA)-rhIFN- $\beta$	27	>100
5ORN(2RaA)-rhIFN- $\beta$	28	>100
5DPA(2UA)-rhIFN- $\beta$	29	88

第2表 化学修飾組換え型ヒト<sup>17</sup>Ser IFN- $\beta$   
の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例番号	相対活性(%)
未修飾 <sup>17</sup> Ser rhIFN- $\beta$	—	100
5CHTM(2EA)- <sup>17</sup> Ser rhIFN- $\beta$	42	70
5PET(3UA)- <sup>17</sup> Ser rhIFN- $\beta$	43	115

第3表 化学修飾天然型 hIFN- $\beta$ の抗ウイルス活性

化合物略号	実施例番号	相対活性(%)
未修飾天然型 hIFN- $\beta$	—	100
5CHTM(2EA)-天然型 hIFN- $\beta$	41	104

以上の結果より、本発明で使用される化学的に修飾されたIFN- $\beta$ はいずれも抗ウイルス活性を保持していることが確認された。

## 試験例2 化学修飾インターフェロン- $\alpha$ の抗ウイルス活性

実施例44から実施例46で得られた化学修飾rhIFN- $\alpha$ 、および未修飾rhIFN- $\alpha$ の抗ウイルス活性を試験例1に示したNR取り込み法で調べた。

各IFN- $\alpha$ を濃度1 $\mu$ g/mlで作用させたときには、化学修飾された各IFN- $\alpha$ （実施例44の5CHTC(2AA)-rhIFN- $\alpha$ 、実施例45の5CHTM(2EA)-rhIFN- $\alpha$ 、実施例46の5PET(3UA)-rhIFN- $\alpha$ ）では、抗ウイルス活性が完全に保持されていた（未修飾rhIFN- $\alpha$ と同等の活性を有していた）。

## 試験例3 化学修飾スーパーオキシドディスムターゼの酵素活性

実施例72～実施例82で調製した化学的に修飾されたSODの酵素活性をMccord, J. M.とFridovich, Iのキサンチン-キサンチンオキシダーゼ-シトクロムC系 [ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、244巻、6049頁 (1969年)] で測定した。SOD活性1ユニット (U) とは、pH7.8、30℃下で、シトクロムCの還元速度を50%阻害するSODの酵素量を示し、以下の式で算出した。

$$\text{比活性 (U/mg)} = \left( \frac{\text{ブランク}}{\Delta A/\text{分}} - 1 \right) \times \frac{1}{0.000256}$$

化学的に修飾されたウシSOD、および化学的に修飾されたヒトSODの酵素活性を各々第4表、第5表に示す。

SOD 50U/ml=0.000256mg (3900U/mgの場合)

$\Delta A/\text{分}$ ：測定値

第4表 化学修飾ウシ Cu, Zn 型スーパーオキシライド  
ディスムターゼの酵素活性

化合物略号	実施例番号	相対活性(%)
未修飾 bSOD	—	100
5CHTC(2AA)-bSOD	72	72
5CHTM(2EA)-bSOD	75	90
5CHTM(2EA)-bSOD (精製品)	76	114
5ORN(2UA)-bSOD	77	82
5DPA(2UA)-bSOD	78	77

活性は未修飾ウシ SOD の酵素活性を 100%とした  
相対活性で表示した。

第5表 化学修飾ヒト Cu, Zn 型スーパーオキシライド  
ディスムターゼの酵素活性

化合物略号	実施例番号	相対活性(%)
未修飾 hSOD	—	100
5CHTM(2EA)-hSOD	80	101
5CHTM(2UM)-hSOD (精製 品)	81	92
5PET(3UM)-hSOD (精製品)	82	50

活性は未修飾ヒト SOD の酵素活性を 100%とした  
相対活性で表示した。

本発明で使用する化学修飾ヒトSODは酵素活性を維持していることが確認された。

試験例4 化学修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体のマウス白血病細胞NFS60に対する増殖促進作用

実施例49～実施例71の化合物、未修飾hG-CSF誘導体および未修飾rhG-CSFのマウス白血病細胞NFS60 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻、6687頁 (1985年)] に対する増殖促進活性を、浅野らの方法 [薬理と治療、19巻、2767頁 (1991年)]



に従って測定した。

実施例49～実施例63および実施例66の化合物を100ng/mlの濃度で細胞に作用させた場合には、未修飾rhG-CSF誘導体（100ng/mlの濃度で細胞に作用させた）と同等のNFS60細胞増殖促進活性が認められた（未修飾rhG-CSF誘導体と同等の活性を保持していた）。

実施例68～実施例70の化合物を100ng/mlの濃度で細胞に作用させた場合には、未修飾rhG-CSF（100ng/mlの濃度で細胞に作用させた）と同等のNFS60細胞増殖促進活性が認められた（未修飾rhG-CSFと同等の活性を保持していた）。

本発明で使用される化学修飾rhG-CSF誘導体および化学修飾rhG-CSFはいずれもNFS60細胞に対する増殖促進作用を維持していることが確認された。

#### 試験例5 化学修飾抗GD3キメラ抗体の結合活性

実施例84で調製した化学修飾抗GD3キメラ抗体の結合活性をKenya.Sらの方法 [キャンサー イミュノロジー アンド イミュノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.)、36巻、373頁 (1993年)] に基づいて測定した。

化学修飾抗GD3キメラ抗体のGD3結合活性を第6表に示す。

活性は、未修飾の抗GD3キメラ抗体の結合活性を100%としたときの相対活性で示した。

第6表 化学修飾抗体のGD3結合活性

化合物略号	実施例番号	相対活性(%)
未修飾抗体	—	100
5PET(3UA)-KM-871	84	20

本発明で使用される化学修飾抗GD3キメラ抗体ではGD3への結合活性が残存していることを確認された。

#### 試験例6 化学修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ のマクロゴール軟膏剤中の安定化効果

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/lりん酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて、1.0mg/mlの濃度になるように実施例26のポリエチレングリコール修飾rhIFN- $\beta$  (5CHTM(2EA)-rhIFN- $\beta$ ) 溶液、未修飾rhIFN- $\beta$  溶液、または未修飾rhIFN- $\beta$  溶液に2mg/mlのmPEG (平均分子量20,000) を添加した溶液を各々調製した。次に、各々の溶液100 $\mu$ lをマクロゴール軟膏基剤 (東豊薬品 (株) 製) 0.9g に添加し、5分間均一に練ることで軟膏剤を調製した。各軟膏剤を100mgずつエッペンドルフチューブに分注し、密閉して室温に保存した。軟膏剤調製直後および24時間後にサンプリングし、エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/lりん酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて軟膏剤を溶解し、抗ウイルス活性を測定した。

軟膏剤調製直後の活性を100%としたときの24時間後の活性を第7表に示す。

未修飾rhIFN- $\beta$ 、および未修飾rhIFN- $\beta$  にmPEGを添加したものでは活性の低下が確認されたが、化学的に修飾されたrhIFN- $\beta$  溶液では活性は維持されていた。

第7表 rhIFN- $\beta$  の軟膏剤中での活性の変化

化合物略号	調製直後	24 時間後
未修飾 rhIFN- $\beta$	100%	89.9%
未修飾 rhIFN- $\beta$ に mPEG を 添加	100%	72.5%
5CHTM(2EA)-rhIFN- $\beta$	100%	112.3%

#### 試験例7 化学修飾組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ の親水軟膏剤中での安定化効果

エチレングリコールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/lりん酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて、1.0mg/mlの濃度になるように実施例26のポリエチレングリコール修飾rhIFN- $\beta$  (5CHTM(2EA)-rhIFN- $\beta$ ) 溶液、または未修飾rhIFN- $\beta$  溶液に2mg/mlのmPEG (平均分子量20,000) を添加した溶液を各々調製した。次に、各々の溶液100 $\mu$ lを親水軟膏 (岩城製薬 (株) 製) 0.9g に添加し、5分間均一に練ることで軟膏剤を調製した。各軟膏剤を100mgずつエッペンドルフチューブに分注し、密閉して37°Cに保存した。各々の軟膏剤を経時的にサンプリングし、エチレングリコ

ールおよび塩化ナトリウムを含む20mmol/lりん酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて軟膏剤を懸濁した。この懸濁溶液中のrhIFN- $\beta$ の含有量を各々ELISAの検量線から算出した。

結果を図1に示す。化学的に修飾されたrhIFN- $\beta$ と未修飾のrhIFN- $\beta$ の濃度はいずれも徐々に低下したが、未修飾rhIFN- $\beta$ に比較し、化学的に修飾されたrhIFN- $\beta$ では残存率が高値を示した。

#### 試験例8 化学修飾ウシCu, Zn型スーパーオキシドディスムターゼのマクロゴール軟膏剤中での安定化効果

20mmol/l酢酸緩衝液 (pH4.5) を用いて、3.73mg/mlの濃度に調製した5CHTM(2EA)-bSOD (精製品) 溶液 (実施例76で調製)、未修飾bSOD溶液、または未修飾bSOD溶液とmPEGを混合したものを各々50 $\mu$ lずつ、マクロゴール軟膏基剤450mgへ加え、均一な軟膏剤を調製した。経時的に50mgずつ採取し、200 $\mu$ lの等張りん酸緩衝液を加え、その一部を用いて活性測定した。

軟膏剤調製直後のbSOD活性を100%として、経時的な活性の変化を図2に示す。軟膏剤では何れも時間と共に活性が低下したが、PEG修飾体の5CHTM(2EA)-bSODのみで長期間高い活性が維持された。

#### 試験例9 化学修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体のマクロゴール軟膏剤中での安定化効果

マクロゴール軟膏基剤 (東豊薬品 (株) 製) 0.9gに酢酸緩衝液 (pH4.5) で6mg/mlの濃度に調製した実施例66の誘導体 (20SPA-rhG-CSF誘導体) 溶液、同濃度の未修飾rhG-CSF誘導体溶液、または同濃度のrhG-CSF誘導体に12mg/mlのmPEG (平均分子量20,000、日本油脂 (株) 社製) を添加した溶液を各々100 $\mu$ l添加し、5分間均一に練ることで軟膏剤を調製した。各軟膏剤を100mgずつエッペンドルフチューブに分注し、密閉して室温に保存した。経時的に各チューブをサンプリングし、150mmol/l塩化ナトリウムを含む20mmol/l酢酸緩衝液を加えて軟膏剤を溶解した。この溶液の上清を実施例23の条件で電気泳動により分析し、蛋白質のバンドの変

化を観察した。

図3及び図4に示すように、化学修飾rhG-CSF誘導体では72時間後もバンドの変化は観察されなかったのに対し、未修飾rhG-CSF誘導体では軟膏剤調製後24時間で次第にバンドが薄くなり、72時間でほぼ完全に消失した。

以上の結果はマクロゴール軟膏剤中では化学修飾rhG-CSF誘導体は安定に存在しているが、未修飾rhG-CSF誘導体は次第に変性し沈殿したことを示唆している。

#### 試験例10 化学修飾組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子誘導体の親水軟膏剤中の安定化効果

親水軟膏（岩城製薬（株）製）0.9gに酢酸緩衝液（pH4.5）で6mg/mlの濃度に調製した実施例66の誘導体（20SPA-rhG-CSF誘導体）溶液、または同濃度の未修飾rhG-CSF誘導体溶液を各々100 $\mu$ l添加し、5分間均一に練ることで軟膏剤を調製した。各軟膏剤を100mgずつエッペンドルフチューブに分注し、密閉して37°Cに保存した。経時的に各チューブをサンプリングし、150mmol/l塩化ナトリウムを含む20mmol/l酢酸緩衝液を加えて軟膏剤を懸濁した。この懸濁溶液を均一になるように懸濁し、15,000回転で20分間遠心分離した。水相（下層）を回収し実施例23と同様の条件で電気泳動により分析した。

図5および図6に37°Cで保存した軟膏剤の経時変化を示す。

化学修飾rhG-CSF誘導体では24時間後もバンドの変化は観察されなかったのに対し、未修飾rhG-CSF誘導体では軟膏剤調製直後から次第にバンドが薄くなり、2時間でほぼ完全に消失した。

図7および図8は、室温で保存した軟膏剤の経時変化を示す。

化学修飾rhG-CSF誘導体では30日後もバンドの著しい変化は観察されなかったのに対し、未修飾rhG-CSF誘導体では次第にバンドが薄くなり、30日後ほぼ完全に消失した。未修飾rhG-CSF誘導体に単にmPEGを添加した溶液（12mg/mlのmPEG（平均分子量：20000）と6mg/mlの未修飾rhG-CSF誘導体を含有した酢酸緩衝液（pH4.5）100 $\mu$ l）で調製した軟膏剤でもバンドの消失は抑制されなかった。

以上の結果は親水軟膏剤中では化学修飾rhG-CSF誘導体は安定に存在している

が、未修飾rhG-CSF誘導体は軟膏剤を保存中に次第に変性したことを示唆している。

#### 参考例1 組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ （未修飾rhIFN- $\beta$ ）の製造

rhIFN- $\beta$ は水上ら [バイオテクノロジー レター (Biotechnology Letter)、第8巻、605頁 (1986年)]、および久我ら [現代化学増刊12：医学における遺伝子工学、135頁 (1986年)、東京化学同人] の方法に従って製造した。

rhIFN- $\beta$ をコードするDNAを含むプラスミドpMG-1を保有する大腸菌K-12株をLGTrpAp培地（バクトトリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、塩化ナトリウム5g/l、グルコース1g/l、L-トリプトファン50mg/l、アンピシリン50 $\mu$ g/l）でシード培養した。rhIFN- $\beta$ の生産には2リッタージャー発酵槽でMCGAp培地（M9培地にカザミノ酸0.5%、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを添加）を用い、グルコース濃度を1%に、pHを6.5に維持して数日間20°Cで培養した。なお、培養液は750rpmで振とうし、毎分1Lでエアレーションした。培養液から凍結融解法 [DNA、2巻、265頁 (1983年)] で抽出液を調製した。さらに、菌体残渣から特開昭61-69799に開示された方法に従ってrhIFN- $\beta$ を得た。

#### 参考例2 組換え型ヒトインターフェロン- $\gamma$ の製造

rhIFN- $\gamma$ は前記rhIFN- $\beta$ の製造法に準じ、伊藤ら [医科分子生物学、355頁 (1987年)、南江堂]、および久我ら (現代化学増刊12：医学における遺伝子工学、135頁 (1986年)、東京化学同人) の方法に従って製造した。

rhIFN- $\gamma$ をコードするDNAを含むプラスミドpKYP10を保有する大腸菌pGKA2株をLGTrpAp培地（バクトトリプトン10g/l、酵母エキス5g/l、塩化ナトリウム5g/l、グルコース1g/l、L-トリプトファン50mg/l、アンピシリン50 $\mu$ g/l）でシード培養した。rhIFN- $\gamma$ の生産には2リッタージャー発酵槽でMCGAp培地（M9培地にカザミノ酸0.5%、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを添加）を用い、グルコース濃度を1%に、pHを6.5に維持して1~2日間37°Cで培養した。なお、培養液は750rpmで振とうし、毎分1Lでエアレーションした。培養液を8,000rpmで、10分間遠心して集菌し、30mmol/L

塩化ナトリウム水溶液、30mmol/Lトリス・塩酸緩衝液（pH7.5）で洗浄した。洗浄菌体を上記緩衝液30mlに懸濁し、0°Cで10分間超音波破碎（BRANSON SONIC POWER COMPANY社、SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、OUTPUT CONTROL 2）した。該超音波破碎物を9,000rpmで30分間遠心分離して菌体残渣を得た。

さらに、菌体残渣に尿素や塩酸グアニジン等の強力な蛋白質変性剤を加えて rhIFN- $\gamma$  を溶解した後に、マーストンらの方法 [バイオ・テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY)、2巻、800頁 (1984年)] に準じ、rhIFN- $\gamma$  を抽出・精製・可溶化・再生した。

### 参考例3 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子 (rhG-CSF) 誘導体の調製

配列番号3に示したアミノ酸配列を有するhG-CSFの1番目のスレオニンをアラニンに、3番目のロイシンをスレオニンに、4番目のグリシンをチロシンに、5番目のプロリンをアルギニンに、17番目のシステインをセリンにそれぞれ置換した rhG-CSF誘導体を、特公平7-96558に記載の方法により取得した。

上記のrhG-CSF誘導体をコードするDNAを含むプラスミドpCfBD28を保有する大腸菌W3110strA株 (Escherichia coli ECfBD28 FERM BP-1479) をLG培地（バクトトリプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5g、グルコース1gを水1Lに溶かし、NaOHでpHを7.0とする）で37°C、18時間培養し、この培養液5mlを25 $\mu$ g/mlのトリプトファンと50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むMCG培地（Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%、塩化ナトリウム0.5%、カザミノ酸0.5%、MgSO<sub>4</sub> 1mmol/L、ビタミンB 14 $\mu$ g/ml、pH7.2）100mlに摂取し、30°Cで4～8時間培養後、トリプトファンの誘導物質である3 $\beta$ -インドールアクリル酸（3 $\beta$ -indoleacrylic acid 以下IAAと略す）を10 $\mu$ g/ml加え、さらに2～12時間培養を続けた。培養液を8,000rpmで、10分間遠心して集菌し、30mmol/L塩化ナトリウム水溶液、30mmol/Lトリス・塩酸緩衝液（pH7.5）で洗浄した。洗浄菌体を上記緩衝液30mlに懸濁し、0°Cで10分間超音波破碎（BRANSON SONIC POWER COMPANY社、SONIFIER CELL DISRUPTOR 200、OUTPUT CONTROL 2）した。該超音波破碎物を9,000rpmで30分間遠心分離して菌体残渣を得た。

菌体残渣からマーストンらの方法[バイオ・テクノロジー(BIO/TECHNOLOGY)、第2巻、800頁(1984年)]に準じ、rhG-CSF誘導体を抽出・精製・可溶化・再生した。

#### 参考例4 組換え型ヒト顆粒球コロニー刺激因子の調製

配列番号3に示したアミノ酸配列を有するrhG-CSFを参考例3に記載した方法に準じて調製した。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、生理活性ポリペプチドに比べて、軟膏剤中での安定性に優れた化学的に修飾された生理活性ポリペプチドを含有する軟膏剤が提供される。

## 請求の範囲

1. 化学的に修飾された生理活性ポリペプチドを含有する軟膏剤。
2. 化学的に修飾された生理活性ポリペプチドが、少なくとも1個のポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチドである請求の範囲第1項記載の軟膏剤。
3. 生理活性ポリペプチドがアスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Dismutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン1~18 (Interleukin 1~18)、インターフェロン- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ )、インターフェロン- $\beta$  (Interferon- $\beta$ )、インターフェロン- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )、インターフェロン- $\omega$  (Interferon- $\omega$ )、インターフェロン- $\tau$  (Interferon- $\tau$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ蛋白質 (Klotho)、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子1~19 (Fibroblast Growth Factor 1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン様成長因子1 (Insulin-like Growth Factor 1)、オステオジェニックプロテイン1 (Osteogenic Protein 1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon Like Peptide)、ナトリウム利尿ベ



プチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor)、抗体もしくはそのフラグメント、または融合抗体である請求の範囲第 1 項または第 2 項記載の軟膏剤。

4. ポリアルキレングリコール類がポリエチレングリコールもしくはその誘導体、ポリプロピレングリコールもしくはその誘導体またはポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール共重合体もしくはその誘導体である請求の範囲第 2 項または第 3 項記載の軟膏剤。

5. ポリアルキレングリコール類が、分子量 500~1,000,000 のポリアルキレングリコール類である請求の範囲第 2 項~第 4 項のいずれかに記載の軟膏剤。

6. 請求の範囲第 1 項~第 5 項のいずれかに記載の化学的に修飾された生理活性ポリペプチドを含有する化粧用軟膏剤。

7. 請求の範囲第 1 項~第 5 項のいずれかに記載の化学的に修飾された生理活性ポリペプチドを含有する保湿用軟膏剤。

8. 軟膏剤の製造のための、請求の範囲第 1 項~第 5 項のいずれかに記載の化学的に修飾された生理活性ポリペプチドの使用。

9. 化粧用軟膏剤の製造のための、請求の範囲第 1 項~第 5 項のいずれかに記載の化学的に修飾された生理活性ポリペプチドの使用。

10. 保湿用軟膏剤の製造のための、請求の範囲第 1 項~第 5 項のいずれかに記載の化学的に修飾された生理活性ポリペプチドの使用。

11. 生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコール類で化学修飾することを特徴とする該生理活性ポリペプチドの軟膏剤中での安定化方法。

12. 生理活性ポリペプチドをポリアルキレングリコール類で化学修飾することを特徴とする該生理活性ポリペプチドの軟膏剤中での活性を維持する方法。

13. 化学的に修飾された生理活性ポリペプチドと軟膏基剤を含有する組成物。

14. 化学的に修飾された生理活性ポリペプチドが、少なくとも1個のポリアルキレングリコール類で化学的に修飾された生理活性ポリペプチドである請求の範囲第13項記載の組成物。

15. 生理活性ポリペプチドがアスパラギナーゼ (Asparaginase)、グルタミナーゼ (Glutaminase)、アルギナーゼ (Arginase)、ウリカーゼ (Uricase)、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide Dismutase)、ラクトフェリン (Lactoferrin)、ストレプトキナーゼ (Streptokinase)、プラスミン (Plasmin)、アデノシンデアミナーゼ (Adenosine Deaminase)、インターロイキン1~18 (Interleukin 1~18)、インターフェロン- $\alpha$  (Interferon- $\alpha$ )、インターフェロン- $\beta$  (Interferon- $\beta$ )、インターフェロン- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )、インターフェロン- $\omega$  (Interferon- $\omega$ )、インターフェロン- $\tau$  (Interferon- $\tau$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、エリスロポエチン (erythropoietin)、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor)、血小板増加因子 (Thrombopoietin)、クローソ蛋白質 (Klotho)、レプチン (Leptin)、繊維芽細胞増殖因子1~19 (Fibroblast Growth Factor 1~19)、ミッドカイン (Midkine)、カルシトニン (Calcitonin)、表皮成長因子 (Epidermal Growth Factor)、グルカゴン (Glucagon)、インスリン様成長因子1 (Insulin-like Growth Factor 1)、オステオジェニックプロテイン1 (Osteogenic Protein 1)、幹細胞増殖因子 (Stem Cell Factor)、アミリン (Amylin)、パラサイロイドホルモン (Parathyroid Hormone)、プラスミノゲン活性化因子類 (Plasminogen Activator)、血管内皮細胞成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)、形質転換成長因子類 (Transforming Growth

Factor)、グルカゴン様ペプチド類 (Glucagon Like Peptide)、ナトリウム利尿ペプチド類 (Natriuretic Peptide)、プラスミノゲン (Plasminogen)、アンジオポエチン (Angiopoietin)、アンジオスタチン (Angiostatin)、エンドスタチン (Endostatin)、肝細胞成長因子 (Hepatocyte Growth Factor)、抗体もしくはそのフラグメント、または融合抗体である請求の範囲第 13 項または第 14 項記載の組成物。

16. ポリアルキレングリコール類がポリエチレングリコールもしくはその誘導体、ポリプロピレングリコールもしくはその誘導体またはポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール共重合体もしくはその誘導体である請求の範囲第 14 項または第 15 項記載の組成物。

17. ポリアルキレングリコール類が、分子量 500~1,000,000 のポリアルキレングリコール類である請求の範囲第 14 項~第 16 項のいずれかに記載の組成物。

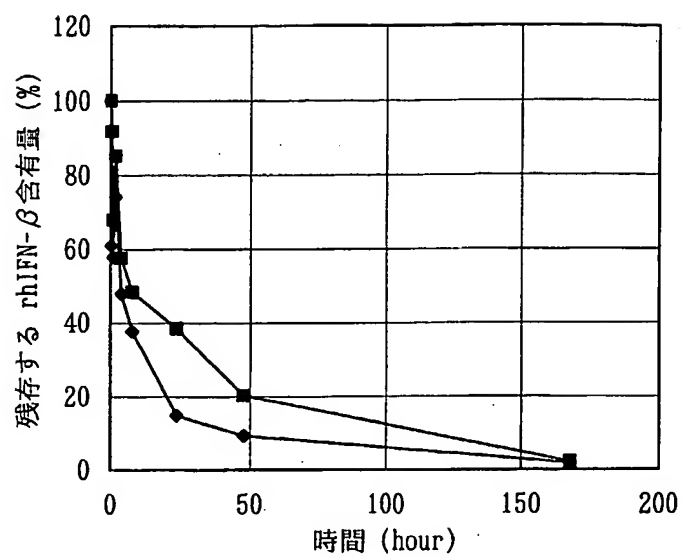


図 1

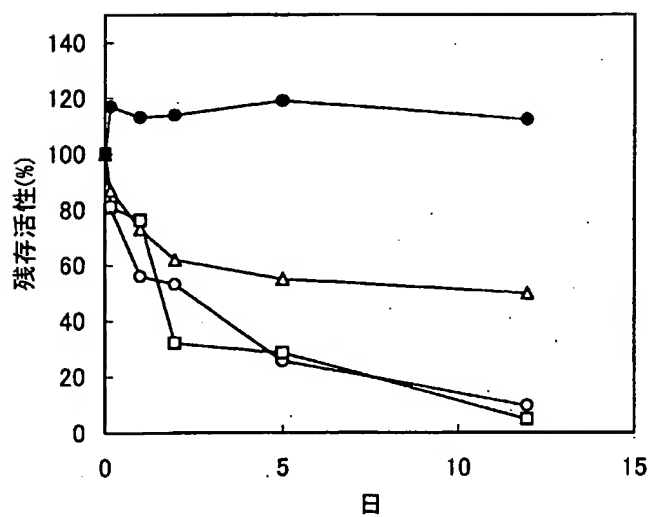


図 2

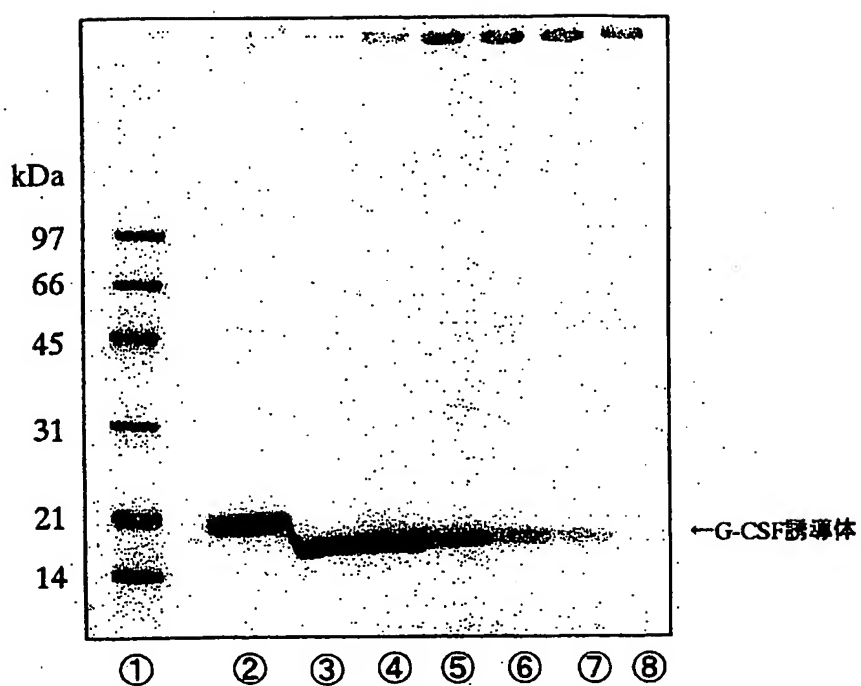


図 3

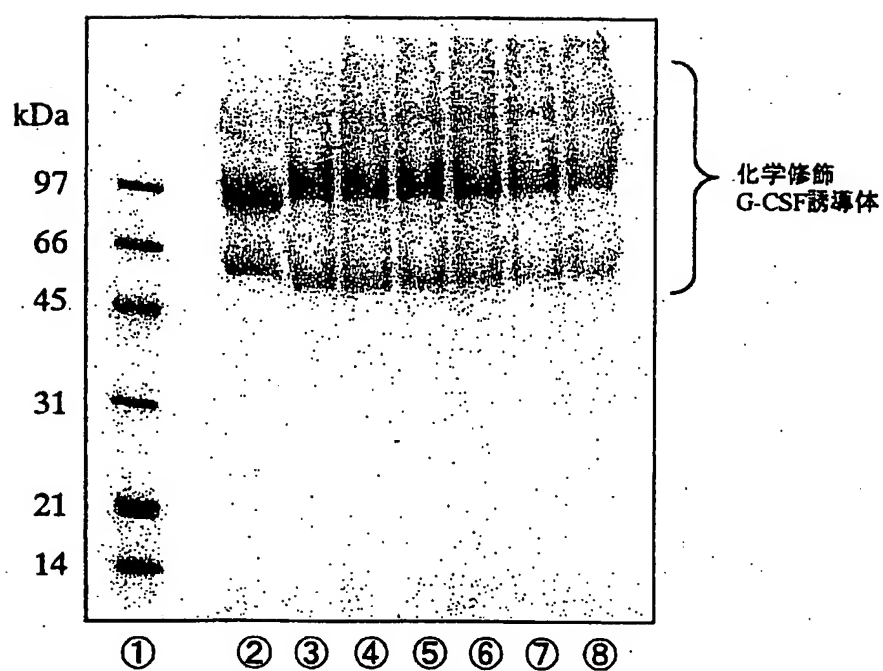


図 4

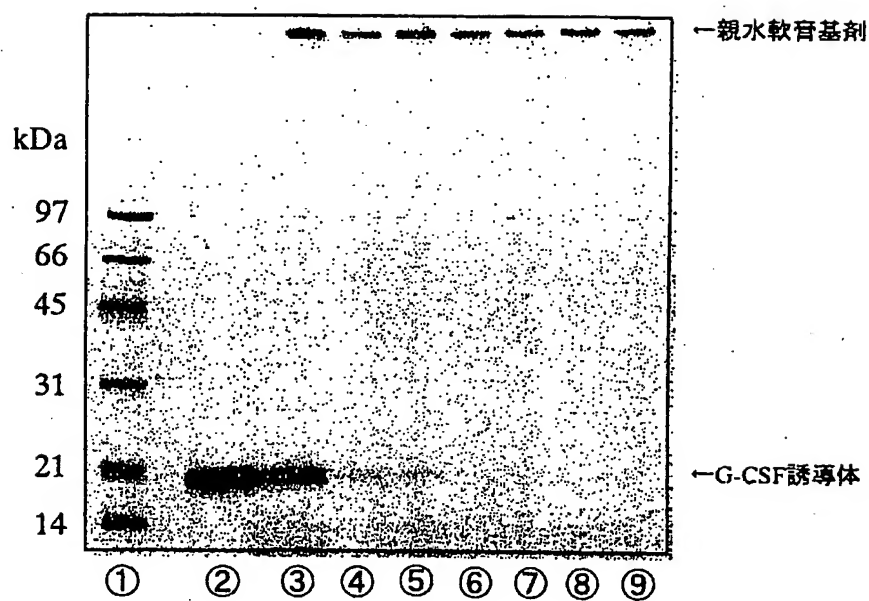


図 5

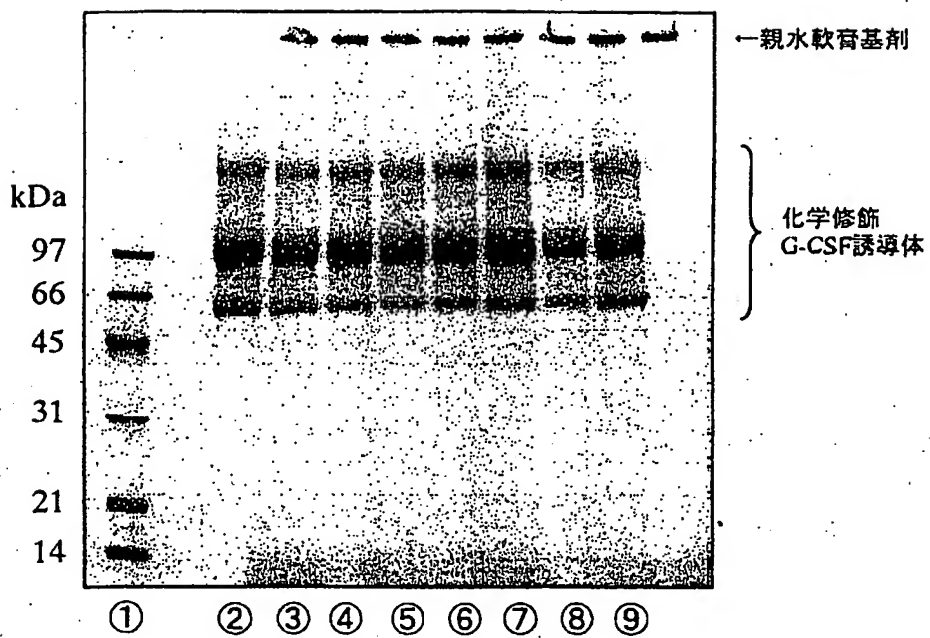


図 6



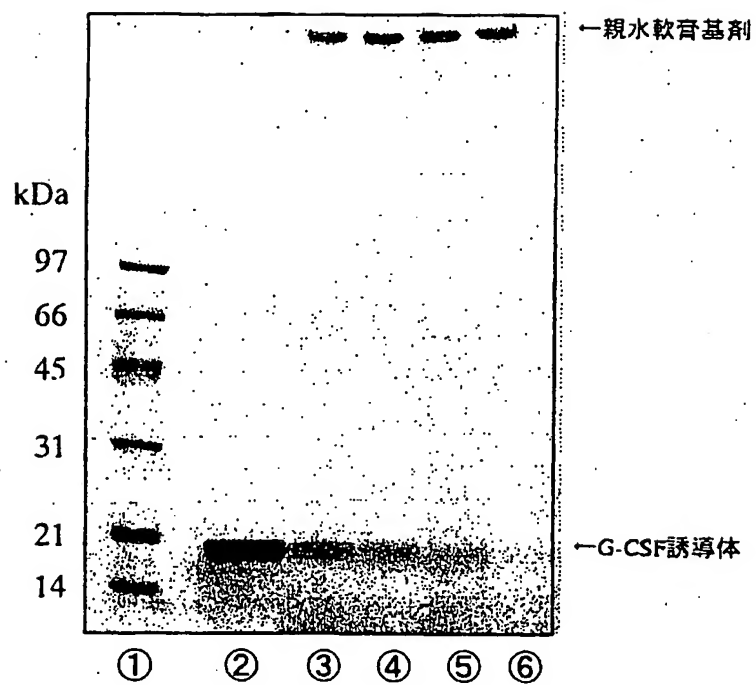


図 7

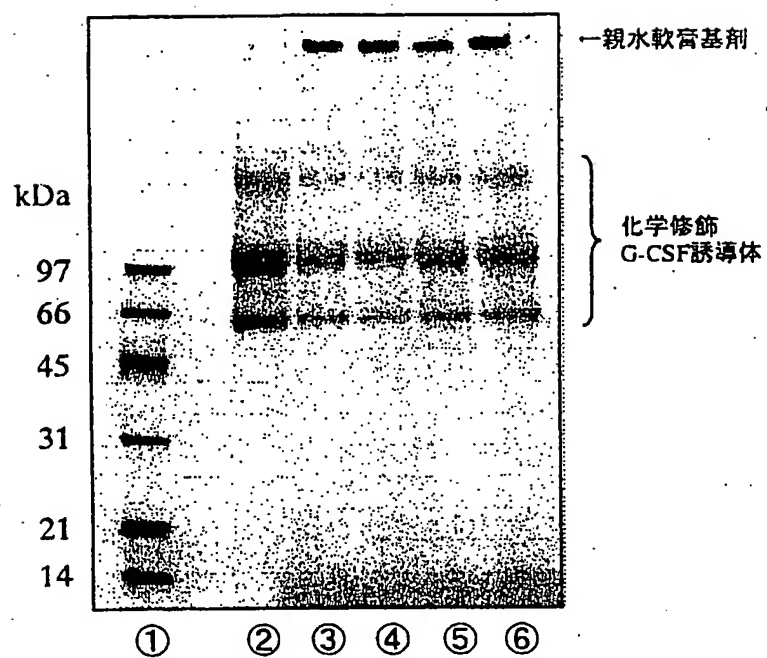


図 8

## 配 列 表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

&lt;120&gt; Ointment

&lt;130&gt; 11398W01

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 2001/190330

&lt;151&gt; 2001-06-22

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 146

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hominidae

&lt;400&gt; 1

Cys	Tyr	Cys	Gln	Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys
1				5					10				15	
Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr
			20						25				30	
Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg
			35						40				45	
Lys	Ile	Met	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe
			50						55				60	
Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr

	65		70		75
Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys					
	80		85		90
Lys Arg Arg Asp Phe Glu Lys Leu Thy Asn Tyr Ser Val Thr Asp					
	95		100		105
Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met					
	110		115		120
Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser					
	125		130		135
Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln					
	140		145	146	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 166

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Hominidae

&lt;400&gt; 2

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe			
1	5	10	15
Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr			
	20	25	30
Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys			
	35	40	45
Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr			
	50	55	60
Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Leu Phe Arg Gln Asp Ser Ser			
	65	70	75
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn			
	80	85	90
Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys			
	95	100	105
Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu			
	110	115	120

His Leu Lys Arg Tyr Thr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala  
                   125                  130                  135  
 Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile  
                   140                  145                  150  
 Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
                   155                  160                  165 166

<210> 3

<211> 174

<212> PRT

<213> Hominidae

<400> 3

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
 -1 1                  5                  10                  15  
 Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu  
                   20                  25                  30  
 Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu  
                   35                  40                  45  
 Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser  
                   50                  55                  60  
 Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His  
                   65                  70                  75  
 Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile  
 80                  85                  90                  95  
 Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala  
                   100                  105                  110  
 Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala  
                   115                  120                  125  
 Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
                   130                  135                  140  
 Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser  
                   145                  150                  155  
 Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro  
 160                  165                  170                  174

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06227

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, 9/06, 7/00, 7/48, 47/30, 47/48, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, 9/06, 7/00, 7/48, 47/30, 47/48, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 1-175999 A (Teijin Ltd.), 12 July, 1989 (12.07.89), Claims; page 9, upper right column (Family: none)	1-17
X	WO 00/033893 A1 (Johnson & Johnson Medical Ltd.), 15 June, 2000 (15.06.00), Example 11 & EP 1053029 A1 & JP 2002-531532 A	1, 3, 6-10, 13, 15
X	JP 1-85934 A (Takara Shuzo Kabushiki Kaisha), 30 March, 1989 (30.03.89), Page 2, upper left column, line 9; lower left column, line 3; lower right column (Family: none)	1, 6-10, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
27 September, 2002 (27.09.02)Date of mailing of the international search report  
08 October, 2002 (08.10.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06227

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-118165 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 09 May, 1995 (09.05.95), Examples (Family: none)	1,3,8,13,15
Y	EP 593868 A1 (F. Hoffman-La Roche AG), 27 April, 1994 (27.04.94), Full text & JP 6-192300 A	1-17
Y	EP 229108 A1 (Cetus Corp.), 22 July, 1987 (22.07.87), Full text & JP 62-503171 A	1-17
Y	EP 210761 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 04 February, 1987 (04.02.87), Full text & JP 62-115280 A	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/00, 9/06, 7/00, 7/48, 47/30, 47/48, A61P43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/00, 9/06, 7/00, 7/48, 47/30, 47/48, A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1992 日本国公開実用新案公報 1971-1992 日本国登録実用新案公報 1994-1996 日本国実用新案登録公報 1996-2002		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 1-175999 A (帝人株式会社) 1989.07.12 特許請求の範囲、第9頁右上欄 (ファミリーなし)	1-17
X	WO 00/033893 A1 (Johnson & Johnson Medical Limited.) 2000.06.15 Example 11 & EP 1053029 A1 & JP 2002-531532 A	1,3,6-10,13, 15
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27.09.02	国際調査報告の発送日 08.10.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 岩下 直人 電話番号 03-3581-1101 内線 6612	4C 9841

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 1-85934 A (資酒造株式会社) 1989. 03. 30 第2頁左上欄第9行, 第2頁左下欄第3行, 第2頁右下欄 (ファミリーなし)	1, 6-10, 13
X	JP 7-118165 A (旭化成工業) 1995. 05. 09 実施例 (ファミリーなし)	1, 3, 8, 13, 15
Y	EP 593868 A1 (F. Hoffman-La Roche AG) 1994. 04. 27 全文 & JP 6-192300 A	1-17
Y	EP 229108 A1 (Cetus Corp.) 1987. 07. 22 全文 & JP 62-503171 A	1-17
Y	EP 210761 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 1987. 02. 04 全文 & JP 62-115280 A	1-17

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月) .